

El análisis funcional de las plaquetas para el diagnóstico de enfermedades neurológicas

Trabajo de Fin de Grado

Departamento de Medicina Física y Farmacología

Curso 2017/2018

Autora:

Angélica Estefanía Figueroa Mora

Tutores:

Ricardo Borges Jurado

Pablo Manuel Montenegro Escudero

RESUMEN

A pesar de los intentos para obtener métodos de detección precoz, el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas continúa siendo clínico y sólo se evidencia cuando ya ha ocurrido una gran destrucción neuronal ello ocurre en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (EP). La dopamina (DA) es el principal neurotransmisor involucrado en la patogénesis de la EP y su pérdida es responsable de la mayoría de sus síntomas. Tanto la DA como su metabolito principal –el DOPAC- son extremadamente citotóxicos, razón por la cual han de almacenarse en vesículas secretoras dentro de las neuronas dopaminérgicas, para evitar su oxidación citosólica. A largo plazo se superan los mecanismos antioxidantes, pudiendo dar lugar a la muerte neuronal progresiva. La DA se acumula en gránulos de secreción (*Secretory Vesicle, SV*) gracias al concurso de tres transportadores vesiculares: la ATPasa de protones vesicular (V-ATPasa), el transportador de monoaminas vesicular (VMAT), y el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Estos tres sistemas son comunes a otras vesículas de secreción de células periféricas tales como mastocitos y plaquetas, que almacenan histamina y serotonina (5-HT), respectivamente. En el actual trabajo, se han definido y optimizado los protocolos de aislamiento y mantenimiento de cultivos de plaquetas aisladas de voluntarios sanos. De igual forma, se validaron los métodos más óptimos para determinar su contenido de catecoles e indoles, su capacidad de captación y liberación. Si estos mecanismos se vieran alterados, podría significar un método de diagnóstico precoz para cualquier paciente con EP.

Palabras clave: plaquetas, gránulos de secreción, Parkinson, dopamina, serotonina.

ABSTRACT

In spite of the efforts for finding early detection methods for the diagnosis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson (PD) is still remaining clinical. Dopamine (DA) is the main neurotransmitter involved in the pathogenesis of PD and its loss is responsible for most of its symptoms. Both the DA and its main metabolite - DOPAC- result extremely cytotoxic. Because of that DA must be stored in secretory vesicles (SV) inside the dopaminergic neurons, preventing their cytosolic oxidation. In the long term, antioxidant mechanisms might be overcome, which can lead to progressive neuronal death. DA is accumulated in SV by means of three main transporters: the vesicular proton ATPase (V-ATPase), the vesicular monoamine transporter (VMAT), and the vesicular nucleotide transporter (VNUT). These three systems are common to other peripheral cell secretion vesicles such as mast cells and platelets, which store histamine and serotonin (5-HT), respectively. In the current work, we have implemented laboratory protocols for the isolation and maintenance of human platelet cultures isolated from healthy volunteers. In the same way, we have validate the optimal methods by determining their catechols and indoles content, their capacity for uptake and release biological amines. Our hypothesis is: if these mechanisms were altered, functional analyses of platelets could serve as a golden method for the early diagnosis degenerative diseases like PD.

Key words: platelets, secretory vesicles, Parkinson, dopamine, serotonin.

ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1. Enfermedad de Parkinson	7
1.1.1. Introducción y epidemiología	7
1.1.2. Etiopatogenia	7
1.1.2.1. Factores ambientales	7
1.1.2.2. Factores genéticos	7
1.1.3. Patogénesis.....	9
1.1.4. Clínica y tratamiento.....	10
1.1.5. Diagnóstico	10
1.2. Dopamina.....	11
1.3. Plaquetas	12
1.3.1. Introducción	12
1.3.2. Uso de plaquetas en el diagnóstico de enfermedades	12
1.3.3. Gránulos de plaquetas	13
2. Objetivos.....	16
3. Material y métodos.....	18
3.1. Obtención, aislamiento y mantenimiento de plaquetas.....	18
3.1.1. Procedencia de las plaquetas.....	18
3.1.2. Protocolo de aislamiento de plaquetas	18
3.1.3. Mantenimiento de plaquetas	19
3.2. Normalización de la cantidad de muestra	20
3.2.1. Contaje de plaquetas	20
3.2.2. Cuantificación proteica	21
3.3. Determinación de la concentración total de catecoles e indoles.....	21
3.3.1. Preparación de muestras para captación de catecoles e indoles	21
3.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica	22
3.4. Determinación de la concentración de serotonina liberada	23
3.4.1. Amperometría en célula única	23
3.4.2. Amperometría en poblaciones plaquetarias	24
3.5. Análisis y estadística de los resultados	25
3.6. Materiales y reactivos	25

4. Resultados y discusión.....	28
4.1. Obtención y mantenimiento de los cultivos de plaquetas	28
4.2. Captación y acumulación de catecoles e indoles en plaquetas	30
4.2.1. Captación y acumulación de 5-OH triptófano y L-DOPA en plaquetas.....	30
4.2.2. Captación y acumulación de serotonina en plaquetas.....	32
4.3. Liberación de serotonina en plaquetas	33
4.4. Perspectivas.....	35
5. Conclusiones.....	37
6. Bibliografía.....	39
7. Anexos.....	43

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico común y complejo caracterizado de forma clásica por la degeneración de la *sustantia nigra pars compacta* y la presencia de cuerpos de Lewy, con deficiencia de dopamina en los ganglios basales que conduce a defectos en los controles motores (Kalia & Lang, 2015).

La incidencia de esta enfermedad se sitúa entre 10-18 casos nuevos por cada 100.000 personas/año, siendo interesante destacar que la relación hombre-mujer es aproximadamente 3:2, por lo que el sexo podría influir en su desarrollo. Sin embargo, el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad es la edad. Se estima que la prevalencia de la EP es aproximadamente del 1% en mayores de 60 años y del 4% en la población mayor de 85 años y que, debido al aumento de la esperanza de vida de la población, se espera que esta aumente en más del 50% para 2030 (Kalia & Lang, 2015)

1.2. ETIOPATOGENIA

La EP es reconocida como el trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. La mayor parte de los casos de EP son esporádicos y parecen ser el resultado de una complicada interacción entre factores genéticos y ambientales que afectan numerosos procesos celulares fundamentales (Kalia & Lang, 2015).

1.2.1. FACTORES AMBIENTALES

De entre los factores de riesgo para la EP se incluyen exposiciones ambientales, como a plaguicidas, los traumatismos craneoencefálicos previos, el uso de β bloqueantes, la actividad agrícola y el consumo de aguas de pozo, principalmente. Además, se ha sugerido que el consumo de antipsicóticos en personas mayores podría aumentar el riesgo de EP. Por otra parte, también hay factores ambientales que se encuentran asociados con una disminución del riesgo entre los que se encuentran el tabaco, las bebidas alcohólicas, el uso de AINEs y los bloqueadores de canales de calcio, además de la práctica regular de ejercicios aeróbicos (Kalia & Lang, 2015).

1.2.2. FACTORES GENÉTICOS

Aquellas personas con historia familiar de Parkinson o temblor presentan mayor riesgo de desarrollar EP, lo cual sugiere que esta enfermedad está relacionada con factores genéticos. Aproximadamente el 15% de los pacientes con EP presentan antecedentes

familiares. Hasta la fecha se conocen al menos 23 loci y 19 genes causantes de la enfermedad, de los cuales 10 son de herencia autosómica dominante y 9 recesivos (Kalia & Lang, 2015). De entre todos los posibles genes implicados en el fenotipo parkinsoniano (**Fig. 01**), algunos tienen especial relevancia en la desregulación de la actividad presináptica, así como en la biogénesis y el tráfico vesicular.

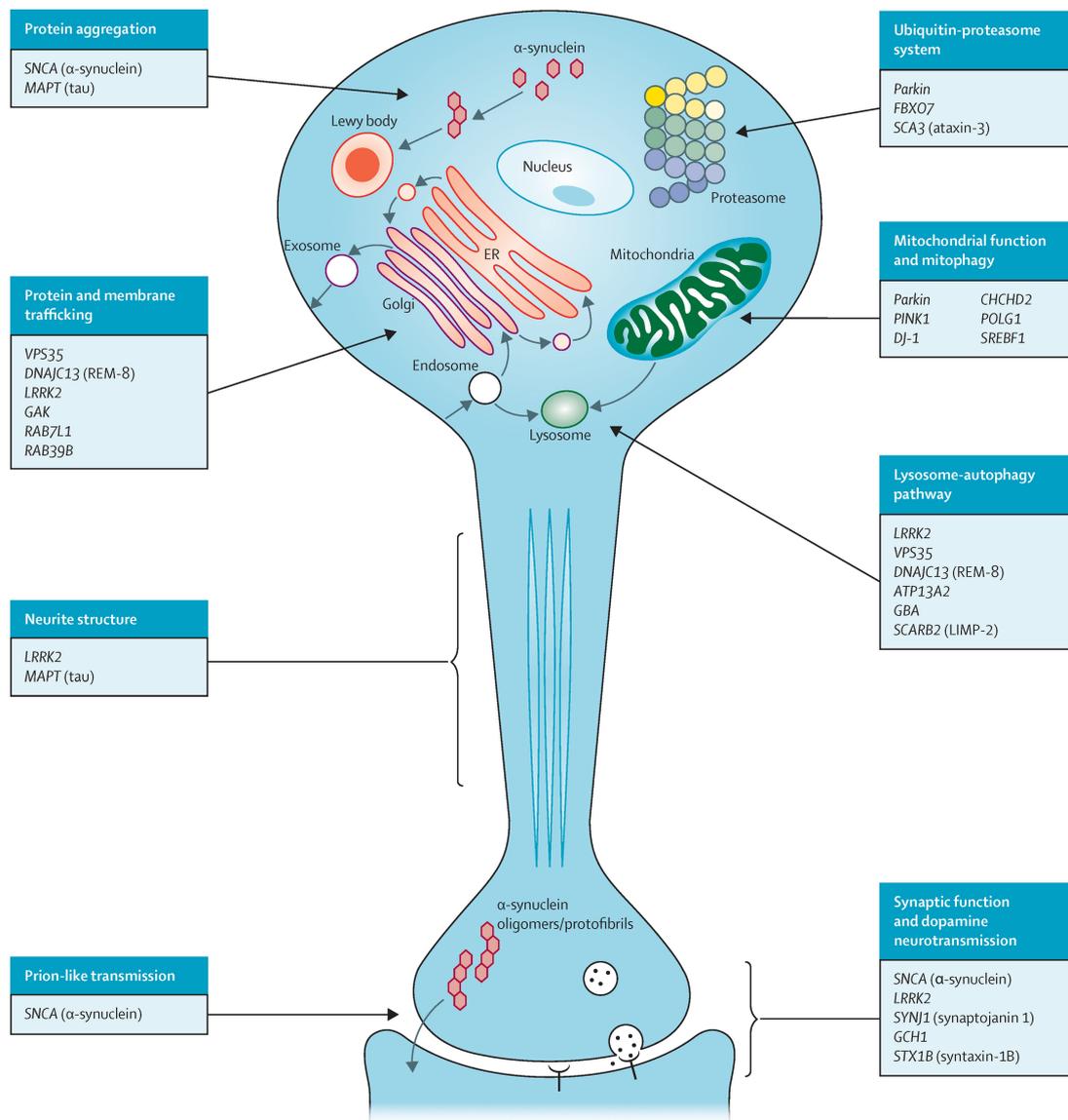


Fig. 01. Procesos celulares involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Se han implicado múltiples genes en la EP identificados como causas de EP familiar, o bien polimorfismos de riesgo para el desarrollo de EP esporádica. Imagen modificada de Kalia & Lang, 2015.

El primer gen que se asoció al Parkinson familiar o hereditario fue el SNCA, que codifica la proteína α -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997). La α -sinucleína es una proteína presináptica expresada fisiológicamente en muchas áreas del SNC humano, y es el principal componente de los cuerpos de Lewy, siendo las formas solubles y oligoméricas

las especies más tóxicas. Las mutaciones de SNCA confieren a la α -sinucleína funciones neurotóxicas, predisponiendo su acumulación y agregación, formando monómeros solubles y fibrillas insolubles de dicha proteína (Soto, 2012; Kalia & Lang, 2015).

Otros de los posibles genes implicados es LRRK2, que la causa más común de EP familiar de herencia autosómica. LRRK2 es una proteína multidominio con funciones enzimáticas duales GTPasa y serina-treonina quinasa. Sus mutaciones pueden causar una alteración de la actividad GTPasa y quinasa, y de ahí, diversas cascadas de señalización que intervienen en el tráfico vesicular, la función citoesquelética, la síntesis proteica y la función lisosomal (Henry et al., 2015).

1.3. PATOGÉNESIS

La patogénesis de la EP aún no está del todo establecida. Aún así, durante años se han propuesto un gran número de mecanismos posibles, entre los que se incluyen un aumento excesivo de radicales libres de oxígeno durante la degradación enzimática de la DA, la disfunción mitocondrial, la pérdida de soporte trófico, la actividad quinasa anormal, la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , la disfunción de procesos degradación proteica y la neuroinflamación (Pringsheim et al., 2014).

Las dos características patogénicas cruciales de la EP son la presencia de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy o neuritas de Lewy, y la degeneración y pérdida selectiva y temprana de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc), que presentan mayor espectro de vulnerabilidad al presentar niveles basales más altos de estrés oxidativo mitocondrial y Ca^{2+} libre citoplasmático que cualquier otra célula examinada (Kalia & Lang, 2015).

Los cuerpos de Lewy consisten en acumulaciones de proteínas anormalmente plegadas compuestos por ubiquitina y fibras de α -sinucleína, principalmente (Bisaglia et al., 2009). La α -sinucleína está involucrada en el control sináptico de procesos de membrana y de liberación de neurotransmisores mediante la interacción con miembros de la familia SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein*). Se cree que esta proteína se adhiere al extremo C-terminal del transportador de DA aumentando su recaptación, aunque sus funciones fisiológicas concretas aún no están del todo definidas. La α -sinucleína es capaz de generar formas oligoméricas debido a su sobreexpresión, cambios en el pH, estrés oxidativo, concentraciones elevadas y mantenidas de Ca^{2+} intracelular o interacciones con la DA. Estas formas alternativas de agregados de α -sinucleína podrían desempeñar un papel importante en la neurodegeneración de la EP (Kalia & Lang, 2015).

1.4. CLÍNICA Y TRATAMIENTO

La EP se caracteriza por una serie de síntomas motores clásicos que son la bradicinesia, rigidez muscular, temblor de reposo y deterioro postural y de la marcha. Además se acompañan de clínica no motora, que consiste en: disfunción olfativa, deterioro cognitivo, síntomas psiquiátricos, trastornos del sueño, disfunción autonómica, dolor y fatiga. Estas últimas están frecuentemente presente en la EP antes del inicio de los síntomas motores clásicos en lo que se conoce como “fase premotora”, que puede tener entre unos 12-14 años de latencia y podría ser crucial para el diagnóstico y tratamiento precoz de la enfermedad. (Kalia & Lang, 2015).

Con respecto al tratamiento, los medicamentos que mejoran las concentraciones de dopamina intracerebral o estimulan los receptores de dopamina siguen siendo la base del tratamiento de los síntomas motores. Estos medicamentos incluyen la levodopa, los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B y, con menos frecuencia, la amantadina. (Kalia & Lang, 2015).

1.5. DIAGNÓSTICO

Aunque el *Gold Standard* para el diagnóstico de la EP es la evaluación neuropatológica, actualmente no existen criterios diagnósticos estandarizados. El uso de técnicas de imagen, tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o los métodos de tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) solo aportarán resultados anormales cuando haya una pérdida sustancial de neuronas dopaminérgicas en el SNpc, siendo ineficaz para el diagnóstico precoz. En personas con familiares que padezcan de una forma monogénica conocida de la EP, las pruebas genéticas pueden ayudar en el diagnóstico, aunque como la mayoría son de penetrancia incompleta, que la prueba sea positiva en un individuo asintomático no proporciona un diagnóstico definitivo (Kalia & Lang, 2015).

Por lo tanto, el diagnóstico actual es principalmente clínico, basándose en la presencia de los síntomas motores clásicos: bradicinesia, rigidez y temblor en reposo, y llegado el caso, confirmándose ante la respuesta favorable al tratamiento empírico con L-DOPA. Hay que tener en cuenta que esta clínica sólo comienza a manifestarse cuando se ha producido un 50-60% de pérdida de neuronas dopaminérgicas y un 70-80% de depleción de DA. Recientes hallazgos han confirmado que la pérdida moderada de neuronas nigroestriatales también está presente en etapas tempranas de la enfermedad, pudiendo ser potencialmente rescatables una proporción de ellas (Kalia & Lang, 2015).

Según estos hechos, sería de un interés clave el establecer un método de diagnóstico precoz de la EP, con el fin de monitorizar el transcurso de la enfermedad y en su caso iniciar un tratamiento preventivo temprano que ralentice su progresión.

2. DOPAMINA

La dopamina (DA) es un miembro de la familia de las catecolaminas biosintetizada tanto en el SNC, mayoritariamente en el área tegmental ventral del mesencéfalo, la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc), y el núcleo arcuato del hipotálamo, como en la médula de las glándulas suprarrenales. Se produce por hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-DOPA mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), y su posterior descarboxilación mediante la enzima Dopa-decarboxilasa más correctamente llamada L-aminoácido aromático descarboxilasa (*Aromatic L-aminoacid decarboxylase*; AAAD) (Fig. 02). En las neuronas, esta síntesis se produce en los terminales axónicos. La DA se empaqueta en vesículas que serán las que se liberarán posteriormente en respuesta a estímulos presinápticos (Zhen Qi, 2008).

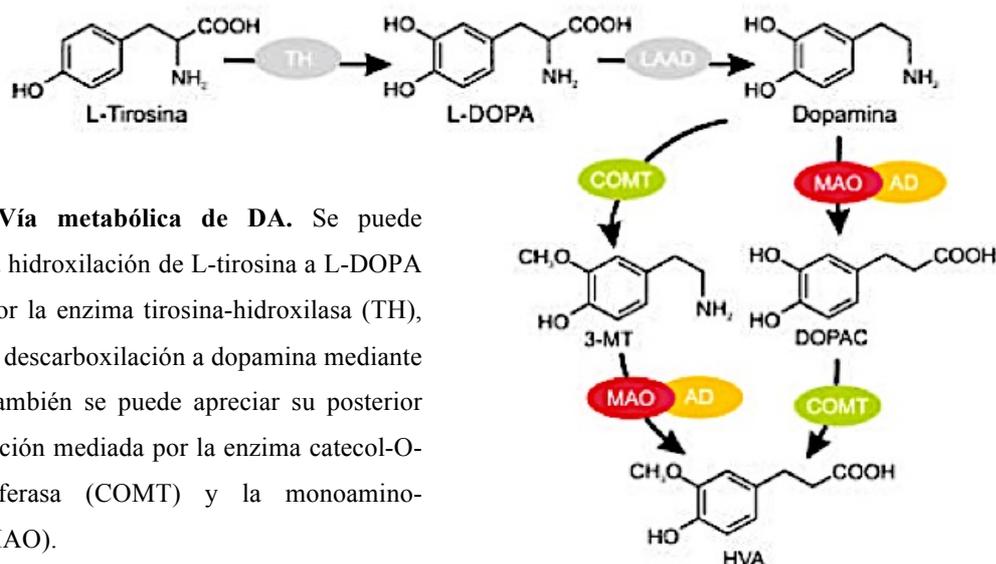


Fig. 02. Vía metabólica de DA. Se puede observar la hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA mediada por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH), y posterior descarboxilación a dopamina mediante AAAD. También se puede apreciar su posterior metabolización mediada por la enzima catecol-O-metil-transferasa (COMT) y la monoaminoxidasa (MAO).

Si la captación de DA por las SV no es óptima, los niveles citosólicos elevados de DA pueden ocasionar toxicidad celular e incluso inducir la muerte neuronal, por lo que la célula posee sus propios mecanismos de protección, como por ejemplo su transformación en compuestos más estables. En las últimas tres décadas se ha postulado que la propia DA, especialmente sus productos de oxidación, junto con los niveles citosólicos de Ca^{2+} elevados y la α -sinucleína, constituyen una mezcla tóxica en la EP, fundamentalmente en

los terminales axónicos y las dendritas, estando relacionada con la pérdida neuronal progresiva que se produce mucho antes de la aparición de las manifestaciones clínicas (Bisaglia et al., 2007; Zucca et al., 2017).

3. PLAQUETAS

3.1. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas o trombocitos son pequeños fragmentos citoplasmáticos, derivados de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos. Carecen de núcleo, miden de 2-3 μm de diámetro y tienen una vida media de entre 8 y 12 días (**Fig. 03**). Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia, iniciando la formación de coágulos o trombos, y además son una fuente natural de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*), un potente agente quimiotáctico, y el factor de crecimiento transformante beta, (TGF- β , *transforming growth factor*) el cual estimula el depósito de matriz extracelular, ambos con un papel significativo en la regeneración y reparación del tejido conectivo (Blair & Flaumenhaft, 2009).

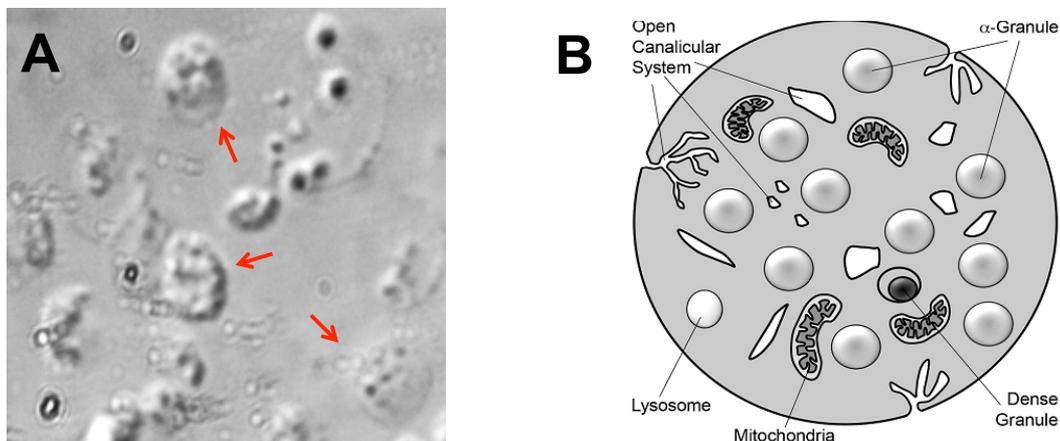


Fig.03. Plaquetas. En el panel A se observa una imagen de microscopía de campo claro donde se muestra un conjunto de plaquetas (flechas rojas). En el panel B están esquemáticamente representados los diferentes compartimentos subcelulares de una plaqueta, entre los que se incluyen los gránulos α y los gránulos densos responsables del almacenamiento de serotonina (Modificado de Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013).

3.2. USO DE PLAQUETAS EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

Las plaquetas, y más concretamente su receptor α_2 -adrenérgico, están demostrando ser biomarcadores útiles en el diagnóstico de otras enfermedades no relacionadas

directamente con la actividad plaquetaria, como en la depresión mayor recurrente o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, entre otros, constituyendo un amplio y prometedor campo de investigación (Deupree et al., 2006; Aleksovski et al., 2017).

3.3. GRÁNULOS DE PLAQUETAS

Los gránulos plaquetarios son únicos de entre todos los gránulos secretores tanto en su contenido como en su ciclo vital. Las plaquetas contienen principalmente tres tipos de gránulos: gránulos α , gránulos densos y lisosomas. Estos gránulos se forman en el cuerpo de los megacariocitos, los precursores plaquetarios. Posteriormente ambos tipos de gránulos maduran en las plaquetas circulantes. Los gránulos α son los más abundantes y contienen una gran variedad de proteínas de membrana y cargas solubles, que se liberan en respuesta a diferentes estímulos mediante proteínas de la familia SNARE. Por su parte, los gránulos densos son menos abundantes (aproximadamente 3-8 por plaqueta) y contienen en su interior altas concentraciones de cationes, polifosfatos, nucleótidos de adenina y aminas bioactivas como serotonina e histamina, que desempeñan un papel crítico en la hemostasia y la trombosis. Ambos tipos de gránulos permanecen almacenados en las plaquetas circulantes hasta que se produce la activación de plaquetaria, que a su vez desencadenará la exocitosis de sus contenidos al intersticio (Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013; Sharda & Flaumenhaft, 2018).

Morfológica y funcionalmente los mecanismos de captación acumulación y liberación de compuestos solubles en los gránulos de secreción de plaquetas son similares a los observados en cultivos neuroendocrinos, por ejemplo las células cromafines o, en nuestro caso, las neuronas dopaminérgicas.

La acumulación de catecolaminas desde el citosol hacia el interior de los gránulos de secreción, se produce a través del transportador VMAT (*Vesicular Monoamine Transporter*). Este sistema de captación utiliza un gradiente protónico generado a su vez gracias a la acción de la ATPasa vesicular de protones, la V-ATPasa. Tanto el VMAT como la V-ATPasa no son exclusivos de las células enterocromafines o las neuronas (VMAT₁ y VMAT₂), sino también se ha encontrado en plaquetas (VMAT₂), siendo éste el responsable de la acumulación de serotonina en las mismas. De hecho, se ha postulado que las plaquetas no sintetizan serotonina por sí mismas, sino que la obtienen directamente de la sangre mediante transportadores de membrana SERT (*Serotonine Transporter*), para posteriormente introducirse en el interior de los gránulos mediante mecanismos de transporte activo mediados por proteínas como VMAT₂. Las mutaciones homocigóticas de

VMAT₂ causan muerte neonatal precoz, mientras que las heterocigóticas generan hipersensibilidad individual a las anfetaminas, la cocaína y el MPTP (*1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina*), una sustancia que ha demostrado producir parkinsonismo en roedores. Otro sistema presente en los gránulos de ambos tipos celulares es el transportador de nucleótidos vesicular VNUT (*Vesicular Nucleotide Transporter*), responsable de la acumulación de ATP en el lumen vesicular (**Fig. 04.**) (Brunk et al., 2006; Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013).

Las bases moleculares de la secreción de gránulos de plaquetas han sido poco estudiadas. Al igual que las células cromafines, las plaquetas almacenan aminos bioactivas y péptidos en altas concentraciones y los liberan rápidamente en respuesta a señales de estrés. Determinar la dinámica de la liberación de los gránulos plaquetarios aportaría una idea del proceso de homeostasis básico, pero además, podría revelar el modelo de disfunción en plaquetas enfermas. Esto es lo que se pretende estudiar con técnicas como la amperometría con fibra de carbono, que monitoriza la secreción dinámica de mensajeros químicos, como la serotonina entre otros, de los gránulos del cuerpo denso en plaqueta aislada.

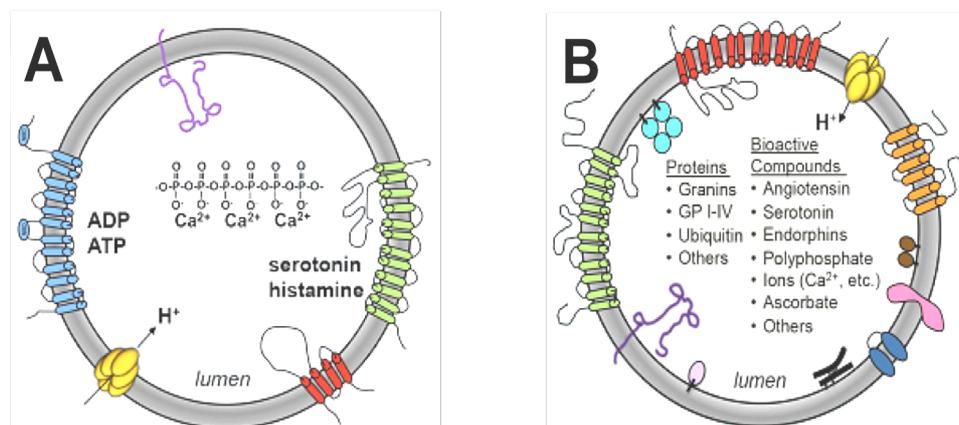


Fig. 04. Esquema comparativo de los diferentes gránulos de secreción. Funcionalmente los gránulos densos de las plaquetas (panel A) presentan similitudes con los gránulos de núcleo denso de los tipos celulares neuroendocrinos (panel B). El sistema VMAT (panel A verde; panel B rojo) es el encargado de la captación de catecoles e indoles, en colaboración con la V-ATPasa de H⁺ (amarillo). Otros sistemas que se muestran son el VNUT responsable de la captación de ATP (panel A azul; panel B verde) y diversos sistemas intercambiadores y transportadores iónicos (imagen modificada de Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013).

OBJETIVOS

Como se ha mencionado, la biosíntesis de DA en neuronas dopaminérgicas se lleva a cabo mediante la hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-DOPA mediada por la enzima TH, y posterior descarboxilación de la misma mediante la enzima DOPA-descarboxilasa; seguidamente el transportador VMAT es el encargado de introducirla en los gránulos de secreción. Estos mecanismos de captación pueden estar desregulados por diversos factores genéticos y ambientales, por lo que la acumulación de DA en los gránulos estará alterada y, por tanto, su concentración citosólica se verá aumentada. Una hipótesis para explicar la génesis de la EP reside en la neurodegeneración causada por la toxicidad de la DA y su principal metabolito (el DOPAC) al encontrarse libres en el citosol, y no en el interior de los gránulos de secreción de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Se ha observado que los SV de plaquetas y estas neuronas comparten similares mecanismos de acumulación de catecolaminas e indoles (dopamina y serotonina, respectivamente). De esta forma, y debido a la imposibilidad de emplear neuronas humanas, el estudio de la capacidad de captación, acumulación y liberación de serotonina en plaquetas purificadas de sangre periférica podría suponer una buena correlación dirigida a un futuro diagnóstico muy precoz de EP, previo a la fase clínica.

Con este fin, el objetivo principal del siguiente trabajo es establecer un protocolo robusto y optimizado de aislamiento y mantenimiento de plaquetas, así como evaluar la determinación de la cantidad de serotonina, su captación y liberación en plaquetas.

Este objetivo se puede establecer en los siguientes apartados:

1. Optimizar un protocolo efectivo de aislamiento de plaquetas, cuantificación y mantenimiento funcional.
2. Determinar la concentración de serotonina y evaluar la capacidad de captación y acumulación de catecoles e indoles totales en plaquetas. Dicho proceso se realizará mediante cromatografía líquida de alta presión con detección amperométrica (HPLC-ED).
3. Medir la liberación de serotonina de plaquetas tras la estimulación con diferentes secretagogos. Se utilizará la amperometría en célula única y la detección electroquímica continua en poblaciones celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE PLAQUETAS

1.1. PROCEDENCIA DE LAS PLAQUETAS

Se han utilizado plaquetas humanas, obtenidas a través de muestras de sangre en solución anticoagulante ACD (*Acid Citrate Dextrose*) de pacientes aleatorios control del Hospital Universitario de Canarias (San Cristóbal de La Laguna, Tenerife).

Como criterios de inclusión, se consideró que los pacientes no tuvieran ni afecciones ni tratamientos que modificaran el comportamiento plaquetario.

1.2. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE PLAQUETAS

El protocolo de aislamiento de plaquetas empleado en el presente trabajo se trata de una modificación de varios protocolos ya estandarizados (Abcam; Ge et al., 2011). La composición de los diferentes medios empleados en el proceso están recogidos en la siguiente tabla (**tabla 01**).

- a. Se extrajeron 2 muestras por paciente de 9-10 mL de sangre periférica (tubos estériles; VACUTEST KIMA[®] K2-EDTA 9 mL). Se voltearon suavemente y se dejaron 15 min de reposo en posición horizontal.
- b. Pasado ese tiempo, se procedió a la centrifugación de los tubos en centrífuga oscilante 20 min a 200 xg con frenado gradual. Se recogió el 2/3 de la primera fracción del sobrenadante correspondiente al PRP (Platelet-Rich Plasma) con pipeta Pasteur (4 mL/tubo aprox.) en tubos cónicos de centrífuga 15 mL estériles (**Fig. 05, panel A**).
- c. A continuación se diluyó el sobrenadante 1:1 en HEP Buffer, se mezcló suavemente por repetidos volteos y se centrifugó durante 15 min a 100 xg con frenado gradual.
- d. Se recogió el sobrenadante con pipeta Pasteur (8 mL/tubo aprox.) en un tubo cónico estéril y se centrifugó 20 min a 800 xg con frenado gradual.
- e. Se desechó el sobrenadante, recogiendo el “pellet” de plaquetas (**Fig. 05, panel B**). Seguidamente se realizaron dos lavados del pellet en 1 mL/tubo de Wash Buffer Platelet por cada tubo. De esta forma se minimiza la contaminación con los posibles eritrocitos y leucocitos restantes de la sangre.

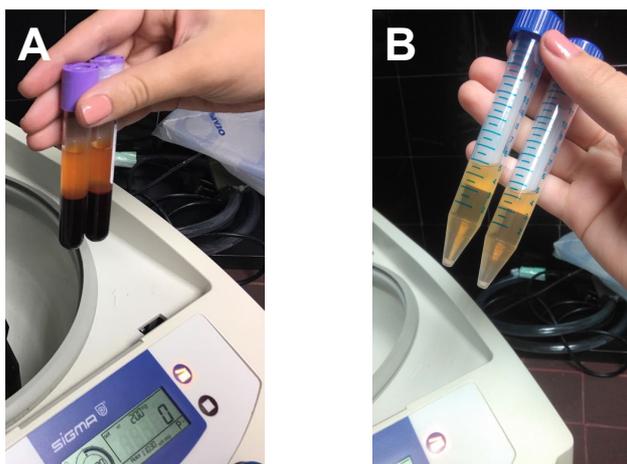


Fig. 05. Etapas de aislamiento de plaquetas humanas. En el panel A se muestra la separación de la fracción correspondiente a PRP. En el panel B se muestra en pellet de plaquetas obtenido, tras la última etapa de centrifugación.

- f. Finalmente se resuspendieron mediante un pipeteado suave ambos pellet de plaquetas en un tubo Falcon biorreactor 50 mL (Tubespin® bioreaktor, TRP) con 8 mL de medio SSP+ suplementado con D-Glucosa 5 mM y antibióticos. Mediante esta operación debería resultar un promedio de 100000 plt/ μ L de solución.

	HEP Buffer	Wash Buffer	SSP+
NaCl (mM)	140,0	150,0	69,3
KCl (mM)	2,7	-----	5,0
Mg₂Cl (mM)	-----	-----	1,5
Na₂HPO₄ (mM)	-----	-----	28,2
EGTA (mM)	5,0	-----	-----
EDTA (mM)	-----	1,0	-----
HEPES (mM)	3,8	-----	-----
D-Glucosa (mM)	-----	50,0	5,0
Acetato-Na⁺ (mM)	-----	-----	32,5
Citrato-Na⁺ (mM)	-----	10,0	10,8

Tabla 01. Composición de los diferentes medios celulares. Todos estos medios se ajustan a un valor de pH 7,4 por adición de NaOH. Se ha mantenido la denominación inglesa para los tampones.

1. 3. MANTENIMIENTO DE PLAQUETAS

Durante el período experimental, las plaquetas se han incubado en medio SSP+ suplementado con D-glucosa 5 mM y antibióticos, a temperatura ambiente, en oscuridad, con intercambio gaseoso y rotación continua (25 rpm, a 45°) para minimizar en todo lo posible la agregación y/o activación plaquetaria. Mediante este protocolo, las plaquetas nos han resultado viables durante un periodo de 7-10 días.

2. NORMALIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE MUESTRA

2.1. CONTAJE DE PLAQUETAS

De entre los métodos posibles para determinar el número de plaquetas en el medio de cultivo, se ha utilizado el conteo mediante hemocitómetro Neubauer. Para el recuento se toman 10 μ L de células, diluyéndolas en 490 μ L de medio SSP+. De esa solución se toman otros 10 μ L diluyéndose en 10 μ L de solución azul tripán. Finalmente se disponen 10 μ L en el hemocitómetro Neubauer, contando las células viables (no coloreadas). Se debe tener especial cuidado en diferenciar las muestras plaquetarias del posible “debris” existente (**Fig. 06**). Para ello el conteo se realiza con el objetivo 40x.

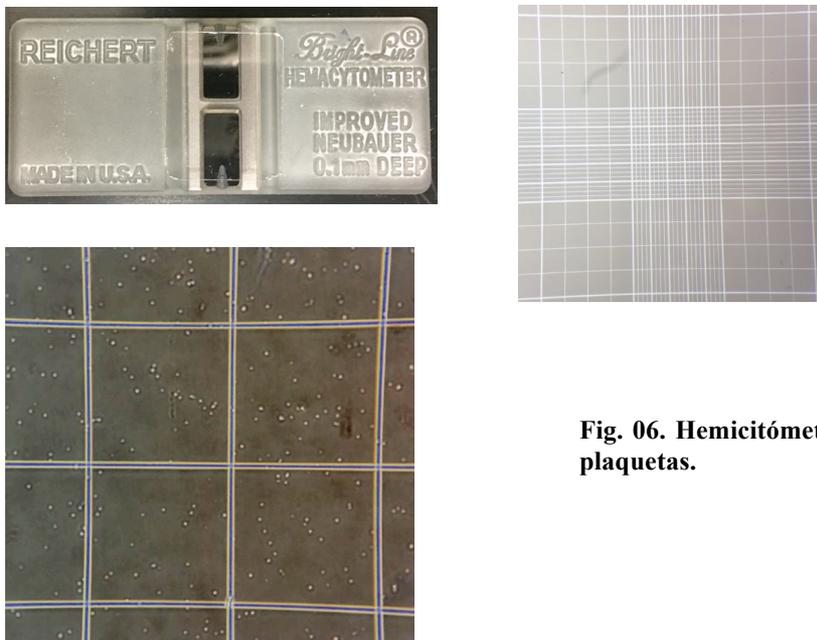


Fig. 06. Hemocitómetro y conteo de plaquetas.

La cuantificación total de plaquetas/mL se realiza aplicando la siguiente fórmula. En el caso presente, la dilución aplicada ha sido 1:100.

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{cuadrado}} \times \frac{1 \text{ cuadrado}}{0,1\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{ml}} \times \text{factor de dilución} = \frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}}$$

La concentración óptima de plaquetas/ml establecida en el presente trabajo se sitúa a 1x10⁸ plaquetas/mL, procediendo a la dilución o concentración de las mismas.

2.2. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Con la finalidad de normalizar las muestras comparadas en los experimentos de captación y liberación de catecoles e indoles que se describirán posteriormente, se ha procedido a realizar una cuantificación de plaquetas a través de la cantidad total de proteína mediante un análisis de proteínas totales utilizando la técnica del ácido bicinonínico.

El BCA (*Bicinchoninic Assay*) se trata de un método de determinación de la concentración de proteínas modificado del método de Lowry basado en la reacción colorimétrica de complejos de cobre con el ácido bicinonínico. Se parte de lisados de plaquetas en medio TENT (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, TritonX 1%, pH 7.4 NaOH) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete®, Roche), realizando el ensayo a una temperatura de trabajo de 0-4°C. En una placa de 96 pocillos se disponen 25 µL de muestra por pocillo con 200 µL de una solución de ácido bicinonínico y CuSO₄ al 0,08%. Seguidamente se incuba la reacción a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. La determinación de la concentración de proteína se realiza mediante lectura en luminómetro (iMark microplate reader, Biotek instruments Inc, Winooski, USA).

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE CATECOLES E INDOLES

La determinación de la concentración total de catecoles e indoles en las muestras plaquetarias se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-ED).

3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CAPTACIÓN DE CATECOLES E INDOLES

Los experimentos de captación y acumulación de catecolaminas e indoles se realizan mediante incubación de las plaquetas en medios que presentan estas sustancias en diferentes concentraciones de trabajo. Todas estas soluciones se prepararon añadiendo ácido ascórbico 100 µM como agente protector frente a la oxidación. La composición de las diferentes soluciones de incubación queda recogida en el **Anexo 01**.

- a. Se tomaron 300 µL de la solución de plaquetas añadiéndose a cada alícuota de la solución de incubación de catecoles e indoles. Según lo establecido en el contaje de plaquetas previo,

debería quedar una concentración total de plaquetas correspondiente a 30×10^6 plaquetas por alícuota.

- b. Seguidamente se procedió a la incubación de las muestras a temperatura ambiente con intercambio gaseoso y agitación suave continua el tiempo deseado: para los experimentos de captación de L-DOPA, serotonina y triptófano, se tomaron diferentes tiempos de incubación de 2 a 24 h. En el caso de las incubaciones con concentraciones crecientes de serotonina, el tiempo de incubación correspondió a 2 h.
- c. Tras finalizar el tiempo de incubación, se dispusieron las muestras en hielo y se centrifugaron durante 10 min a $0-4^{\circ}\text{C}$ y 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet de plaquetas con medio SSP+ glucosa.
- d. Se añadió 150 μL de TENT suplementado con Complete al pellet de cada alícuota y se sonicaron las muestras en baño frío durante 20-30 min, lisando la muestra. Tras ese tiempo, los lisados se centrifugaron en frío a 13.000 rpm durante 5 min y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.
- e. Se tomaron 50 μL del sobrenadante del lisado y se precipitaron las proteínas en 50 μL HClO_4 0,8 N, quedando así una solución HClO_4 0,4 N rica en catecoles o indoles, que se llevó a dilución 1:10 en HClO_4 0,4 N con dihidroxibencilamina (DBHA) o isoproterenol (IP) 200 nM como patrón (estándar) interno para la detección optimizada en HPLC.
- f. Finalmente, con el resto del lisado se realizaron las determinaciones de proteínas por BCA.

3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA (HPLC-ED)

La determinación de la concentración total de catecoles e indoles en las muestras plaquetarias ha sido realizada por HPLC-ED por el Dr. Ricardo Borges (**Fig. 07**). Las muestras se analizaron mediante un cromatógrafo líquido provisto de (Shimadzu) provisto de un inyector automático (modelo SIL-6B, Shimadzu). Utilizamos un flujo de 1 mL/min. La separación se realizó con una columna (Tracer Analítica, Teknokroma, Barcelona) de 12,5 cm de largo con relleno Spherisorb ODS-2 con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil para la separación de CA que se empleó fue un tampón fosfato: 9,66 g/L de NaH_2PO_4 ; 3,72 mg/L de EDTA y 1 g/L de heptanosulfonato sódico (PIC-B7). El pH se ajustó a 3,1 con ácido fosfórico. Se añadió metanol al 7-10% (v/v). La mezcla se filtró mediante un filtro de 0,22 mm (Millipore) y se desgasificó por burbujeo con helio, protocolo estandarizado en este laboratorio.

La detección electroquímica se llevó a cabo un voltaje constante de +650 mV o

+700mV, frente al electrodo de referencia, dependiendo del potencial redox de las catecolaminas o indoles. Se empleó un detector electroquímico (modelo LC- 4B, Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA) y una frecuencia de adquisición de 1 Hz empleando un programa de adquisición desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer González.

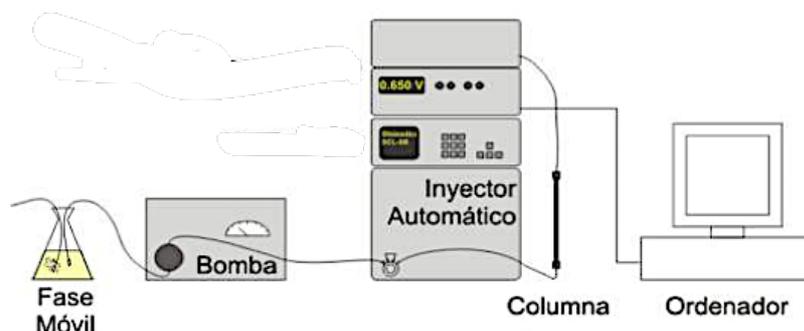


Fig. 07. Esquema del equipo cromatográfico. En el siguiente esquema se muestran los principales componentes del HPLC.

Para el análisis de los picos cromatográficos de las catecolaminas se empleó el estándar interno dihidroxibenzilamina (DHBA) o isoproterenol (IP) a una concentración conocida (200nM), así como una mezcla de estándares (L-DOPA, 5-OH-triptófano, dopamina y serotonina) a concentraciones conocidas, aplicando un factor de corrección.

Una vez calculada la concentración de las moléculas de interés se normalizan los datos por la proteínas totales de la muestra (determinado por el método del ácido bicinconínico, que se ha explicado con anterioridad).

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA LIBERADA

La determinación de la concentración de catecolaminas e indoles liberados en las muestras plaquetarias se ha llevado a cabo mediante las técnicas de amperometría en célula única y continua electroquímica en poblaciones celulares (**Fig. 08**). Ambos protocolos y manejos experimentales han sido realizados por el Dr. Pablo Montenegro.

4.1. AMPEROMETRÍA EN CÉLULA ÚNICA

La fabricación y calibración de los electrodos capilares de fibra de carbono utilizados para la detección amperométrica son protocolos comúnmente empleados en nuestro laboratorio y, por tanto, no se entrará en detalle de los mismos.

Las plaquetas en suspensión fueron sembrados en cubreobjetos circulares de vidrio de 5 mm de diámetro recubiertos con poli-L-lisina a 1×10^6 plaquetas/cubreobjetos 5-10 min antes de comenzar la medición, para minimizar la activación plaquetaria. Las soluciones del baño y de microinyección fueron medios SSP+ 5 mM D-glucosa, libres de Ca^{2+} o con 2 mM de Ca^{2+} dependiendo del estímulo activador de la secreción. Las células fueron estimuladas mediante pulsos de 10 s de duración con una solución de trombina (Trb) 4U/mL o ionomicina (Iono) 10 μM disueltas en SSP+ 5mM D-glucosa, libre de Ca^{2+} o con 2 mM de Ca^{2+} respectivamente.

Los registros amperométricos se llevaron a cabo, en un microscopio invertido (Olympus Corporation X-50, Tokyo, Japón) colocado sobre una mesa antivibratoria (GyroMini, Labmed Instrument, Inc, Guangzhou, China) sitios en el interior de una jaula de Faraday. Para la amperometría se usó un potencióstato (VA-10X, NPI electronic GMBH, Tamm, Alemania). El electrodo de trabajo se conecta al preamplificador y se monta sobre un micromanipulador motorizado (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Un sistema similar se monta en el otro lado, permitiendo el posicionamiento de la micropipeta con la que aplicamos los secretagogos. Este sistema de inyección por presión, fabricado en nuestro laboratorio, está regulado por electroválvulas (Lee, Westbrook, USA) que pueden ser controladas manualmente o por ordenador. Las células se colocan en una cámara de metacrilato que tiene incorporado un electrodo de referencia de microagregados de plata y pata clorurada (Ag/AgCl). Entre los dos electrodos se ajusta el potencial de oxidación a +700mV, un potencial superior al redox de la serotonina. La frecuencia de muestreo para plaquetas es de 10 kHz, la misma descrita en por otros laboratorios para muestras de este tipo (Ge et al; 2009). El programa de adquisición y control del amplificador utilizado es PowerLab/LabChart (ADInstruments, New South West, Australia).

La secreción de aminas biógenas es discontinua, y cada deflexión o “espiga” se corresponde con la medición de catecoles e indoles secretadas desde una sola vesícula. Una vez identificadas las espigas, se obtienen sus correspondientes parámetros cinéticos que permiten su selección y posterior cuantificación y análisis estadístico (Machado et al., 2008).

4.2. AMPEROMETRÍA EN POBLACIONES PLAQUETARIAS

Para estudiar la secreción en poblaciones, las plaquetas se colocaron sobre filtros de 0,2 μm (Whatman, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), permitiendo una distribución de las mismas de forma homogénea. Seguidamente se dispuso el filtro en el

sistema de perfusión donde las plaquetas fueron perfundidas con la solución SSP+ 5 mM D-glucosa a un flujo de 1mL/min y el flujo que atraviesa las mismas es dirigido hacia un detector electroquímico (LC-4B, BioAnalytical System) con un potencial de oxidación de +700mV, conectado a un sistema de adquisición PowerLab 8/30 (ADInstruments, New South West, Australia).

Las células fueron estimuladas mediante pulsos de 10 s de duración ($\approx 600 \mu\text{L}$) con una solución de trombina (Trb) 4U/mL en SSP+ 5mM D-glucosa mediante un inyector de 6 vías.

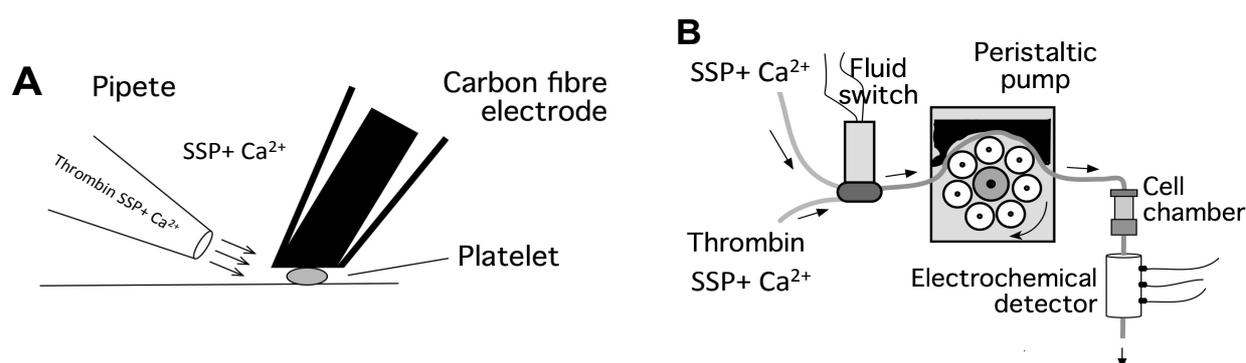


Fig. 08. Esquemas de los sistemas de detección amperométrica de catecoles e indoles liberados. Se muestran los diversos componentes de los sistemas de amperometría en célula única (panel A) y poblaciones de plaquetas (panel B).

5. ANÁLISIS Y ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS

El análisis de datos amperométricos se llevó a cabo usando ficheros con formato binario de IGOR-Pro (Wavemetrics, OR, USA) y empleando una serie de programas desarrollados en nuestro laboratorio (Segura et al, 2000), que permiten la automatización del proceso de análisis, el programa se denomina “Spike 32”. La secreción de serotonina en los experimentos de población celular o cantidad total de catecoles e indoles fue cuantificada mediante la integración de las curvas sobre los niveles basales. Los datos están representados como medias +/- desviación estándar.

6. MATERIALES Y REACTIVOS

- La serotonina, L-DOPA, noradrenalina y triptófano fueron suministrados por Sigma-Aldrich.
- Salvo que se indique lo contrario, las sales y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) o Merck (Darmstadt, Alemania).

- Las placas de 96 pocillos donde se realizaron las determinaciones de concentración proteica son de Nunc (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).
- Todo el material necesario para la realización de las electroforesis fue suministrado por BioRad (California, USA).
- El agua fue purificada en un sistema Elix10/MilliQ Gradient A-10 de Millipore (Darmstadt, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE PLAQUETAS

Mediante el protocolo de aislamiento de plaquetas que hemos establecido en nuestro laboratorio, se ha conseguido satisfactoriamente el cultivo de plaquetas aisladas, minimizando considerablemente la presencia de otros componentes celulares del PRP, como los eritrocitos y los leucocitos, entre otros. Durante el proceso, tal y como se ha mencionado, los medios empleados se han ajustado a pH fisiológico de 7,4 ya que hay estudios que afirman que los pH alcalinos y mantenimiento del gradiente entre el compartimento intragranular y el espacio extracelular tienen un efecto fundamental sobre la secreción de los gránulos densos de las plaquetas, produciendo un alto flujo de mensajero químico, y por tanto, la activación plaquetaria (Ge et al., 2009).

Una vez aisladas, si las observamos con detenimiento en microscopio óptico, se podrían distinguir las plaquetas quiescentes de aquellas que han sufrido activación, ya que las primeras suelen ser redondas, mostrando refracción a la luz, mientras que, por su parte, las activadas tienen forma espiculada y suelen ser grisáceas, tornándose de color más oscuro al emplear ópticas de contraste de fase (Ge et al., 2009). No obstante, es difícil establecer la proporción de células activadas y no activadas presentes. Con el fin de minimizar en todo lo posible dicha activación plaquetaria todos los pasos del aislamiento se han realizado con extrema precaución. Además, estamos valorando la utilización de prostaglandina- E_1 como agente antiagregante en las etapas más críticas del procedimiento de aislamiento, particularmente en las de centrifugación ya que son aquellas en las que hay mayor riesgo de activación plaquetaria.

En la etapa final del aislamiento, las células se han mantenido en medio SSP+ suplementado con 5 mM de D-glucosa a una concentración en torno a 100.000 plaquetas/ μ L (1×10^8 plaquetas/mL). Se ha establecido que dicha concentración de plaquetas es la más óptima para la realización de los posteriores experimentos tanto de captación y acumulación como de liberación de catecoles e indoles, hecho que coincide con lo citado por otros autores (Ge et al., 2009; Ge et al., 2010; Ge et al., 2011).

Para determinar dicha concentración, la cuantificación de plaquetas se ha realizado a través del conteo por hemocitómetro con exclusión del azul tripán, que además nos permite ver la viabilidad de las propias plaquetas. El azul de tripán no atraviesa la membrana celular por lo que las plaquetas rotas se tiñen de azul. Si bien este proceso de conteo resulta económico, también es tedioso y presenta gran variabilidad tanto subjetiva como objetiva. Por una parte, el tamaño plaquetario dificulta la diferenciación de estas

células frente a restos celulares intrínsecos al propio medio. Por otra parte, con el fin de minimizar el tiempo necesario para el conteo, se debe aplicar un gran factor de dilución. Este hecho, aumenta la probabilidad de errores tanto sistemáticos como aleatorios en la determinación del número de plaquetas existentes.

En la literatura se han propuesto otros posibles métodos de cuantificación de plaquetas como podría ser el conteo mediante citómetro de flujo (Salignac et al., 2013). El citómetro de flujo presenta la posibilidad de dar un conteo con alto grado de exactitud y reproducibilidad de las muestras obtenidas, que a parte, puede verse optimizada mediante algún marcaje específico de plaquetas, discriminándolas con mayor precisión. No obstante, su utilización conlleva un considerable gasto de muestra y aumento del tiempo experimental, además del elevado coste del propio equipo empleado. Actualmente, en nuestro laboratorio, se está intentando establecer un tercer sistema de conteo mediante análisis turbidimétrico. Dicho análisis se está llevando a cabo a través de un espectrofotómetro Génesis20 (ThermoSpectronic) a una longitud de onda no destructiva de 600 nm, comparando los datos obtenidos con el correspondiente conteo por citometría y hemocitometría. Las principales ventajas de este sistema radican en su rapidez, sencillez y bajo coste, además de ser un método no destructivo de la muestra. No obstante, se deben realizar más determinaciones con el fin de asegurar la reproducibilidad y repetibilidad de este sistema de medida.

Una de las principales desventajas del aislamiento y mantenimiento de plaquetas es la facilidad de activación de las mismas que resultó un factor crítico en nuestros experimentos. En el caso del mantenimiento, se ha buscado un medio que permita que las plaquetas se mantengan en un estado quiescente.

Diversos autores han propuesto que el medio más óptimo se trata del medio de cultivo denominado SSP+, con resultados que sugieren que con este medio podría conseguirse el almacenamiento de plaquetas hasta 9 días, aunque recalcan que se requieren estudios *in vivo* para confirmar estos resultados *in vitro* (Hornsey et al., 2006). De hecho, este medio es el comúnmente empleado en la conservación y transfusión de PRP, estando éste al 20-30% de concentración frente a la solución aditiva de plaquetas. En nuestro caso, hemos utilizado este medio íntegramente en plaquetas aisladas.

El metabolismo plaquetario se produce fundamentalmente por dos mecanismos: glicólisis anaerobia y fosforilación oxidativa dependiente de oxígeno. La glicólisis durante la conservación *ex-vivo* produce la acumulación de ácido láctico y el descenso del pH, por ello el medio SSP+ contiene acetato, que actúa como una fuente alternativa de energía para

las plaquetas, además de ejercer la función de tampón biológico junto al citrato, interviniendo en la quelado del Ca^{2+} , uno de los principales desencadenantes de la activación plaquetaria. En su composición también destacan el Mg^{2+} y el K^+ , que han demostrado su eficacia en la conservación de las propiedades plaquetarias in vitro, además de prevenir la glicólisis acelerada. Sin embargo, a pesar de que el medio SSP+ mantiene las plaquetas quiescentes, se han documentado fenotipos pro-apoptóticos e incremento de marcadores de activación plaquetarias, sobretodo a partir de los 5-7 días del mantenimiento del cultivo de forma secundaria a la rápida depleción de glucosa y el descenso en la producción de lactato. Con el fin de solventar dicho problema, se ha suplementado el medio con una concentración de 5 mM de D-glucosa. Se ha evidenciado que la reformulación de nuevas soluciones aditivas de plaquetas conteniendo D-glucosa o bicarbonato aumentan la estabilidad temporal de las soluciones de PRP y por tanto, en nuestro caso, la estabilidad temporal del cultivo (Johnson et al., 2015).

2. CAPTACIÓN Y ACUMULACIÓN DE CATECOLES E INDOLES EN PLAQUETAS

2.1. CAPTACIÓN Y ACUMULACIÓN DE 5-OH TRIPTÓFANO Y L-DOPA EN PLAQUETAS

En un principio se llevó a cabo la incubación de las plaquetas con concentraciones conocidas de los precursores 5-OH triptófano y L-DOPA, y serotonina con el fin de evaluar la capacidad de producción de catecoles e indoles en el citosol, así como los mecanismos implicados en su captación y acumulación en el interior de los gránulos de secreción. Tras una incubación de 2 h, el lisado de las plaquetas, y la extracción de catecoles e indoles, las muestras fueron procesadas mediante HPLC, obteniendo así registros de la cantidad total de catecoles e indoles presentes. En la **Fig. 09** se puede observar el cromatograma de los componentes solubles susceptibles de oxidación en el lisado de muestras plaquetarias control, L-DOPA, triptófano y serotonina.

Los primeros picos (o frente) es causado por el HClO_4 . Seguidamente aparecen una serie de componentes solubles cuyo origen es desconocido, posibles metabolitos secundarios de alguna de las rutas sintéticas. El primer pico rojo que se resuelve corresponde a la L-DOPA, tras el cual aparece el estándar interno (DHBA), observándose en todos los registros. Sin embargo, en no se detectó la presencia de DA, que debería aparecer a un tiempo de elución posterior al estándar interno, tal y como queda remarcado

por la flecha roja. Por otra parte, observando el registro de incubación con triptófano, este aparece inmediatamente después de la elución del DBHA, sin verse modificada la cantidad total de serotonina (recuadro azul). Finalmente la incubación de las muestras plaquetarias con serotonina desencadenaron un aumento considerable de este indol, como se muestra en el registro cromatográfico.

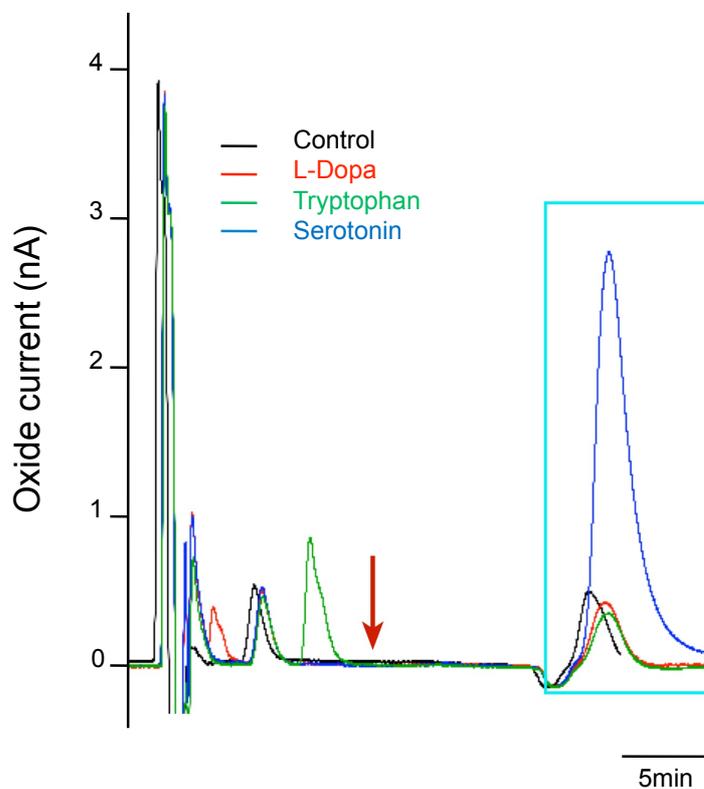


Fig. 09. Cromatograma de captación y metabolismo de catecoles e indoles en plaquetas. Las diferentes muestras se encuentran diluidas en HClO₄ con dihidroxi-bencilamina 200 nM (DBHA) como estándar interno. En el registro se encuentran representados extractos de plaquetas control (negro), L-DOPA 100uM (roja), 5OH-triptófano 100uM (verde) y serotonina 100 uM (azul). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en soluciones con ácido ascórbico 100 uM como agente antioxidante, durante 2h. Este registro es representativo de 4 experimentos similares de cada tipo. La flecha roja indica el lugar en dónde debería aparecer la DA.

Se realizó el mismo proceso de incubación con un transcurso temporal mayor entre los que se comprenden 4, 6, 8 y 24 horas con el fin de desestimar que la actividad de transformación de esos precursores de catecoles e indoles requiriese un mayor tiempo de actuación. De igual forma, los resultados evidenciaron que tanto la L-DOPA como el 5-OH triptófano no se transformaron en DA o serotonina, respectivamente.

Puesto que la L-aminoácido aromático descarboxilasa (*Aromatic L-aminoacid decarboxylase*; AAAD) es la enzima responsable de la transformación tanto del triptófano en serotonina y de la L-DOPA en DA, estos resultados dan indicios de que las plaquetas no presentan actividad AAAD o bien esta actividad es muy baja. Este hecho se correlaciona con lo citado por otros autores en los cuales, si bien los megacariocitos presentan maquinaria de producción de catecoles e indoles, las plaquetas carecen de ella o bien su actividad es muy baja, y por tanto, la serotonina acumulada es previamente captada de la sangre (Sharda & Flaumenhaft, 2018).

2.2. CAPTACIÓN Y ACUMULACIÓN DE SEROTONINA EN PLAQUETAS

Uno de los principales apartados del presente trabajo ha sido tratar de evaluar la capacidad de captación y acumulación de serotonina en el citosol y, consecuentemente, en los gránulos de secreción de plaquetas con el fin de valorar si existen diferencias significativas de dichos mecanismos en pacientes control con respecto a aquellos parkinsonianos diagnosticados. Para ello, se ha diseñado un experimento que consiste en la incubación de plaquetas en soluciones de concentración creciente de serotonina y posterior análisis del extracto de muestra mediante HPLC.

En la siguiente figura se muestra la captación de serotonina total en relación a la concentración de serotonina incubada (**Fig. 10, paneles A, B y C**), así como el cociente de captación con respecto a la concentración basal (**Fig. 10, paneles D, E y F**).

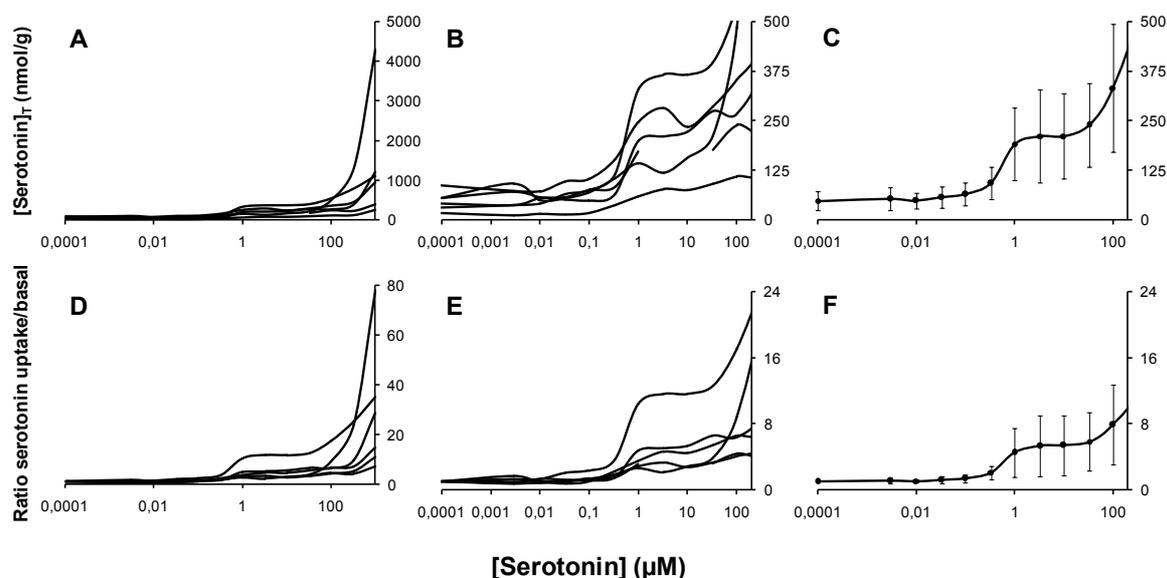


Fig. 10. Gráficas de captación de serotonina. Los cultivos de plaquetas fueron incubados con soluciones de concentración creciente de serotonina a T° ambiente durante 2 h, midiendo la captación total por HPLC. En los paneles A y B se muestran las concentraciones de serotonina total acumulada tras la incubación y los paneles D y E el cociente de captación con respecto a la concentración basal. Los paneles C y F muestran las respectivas media de cada gráfica.

Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración de serotonina en las soluciones de incubación, se produce un incremento progresivo de la acumulación total de serotonina, siendo más notable a partir de una concentración de 100 nM de serotonina, hasta que los mecanismos de captación y liberación se estabilizan en torno a una concentración de la solución de incubación alrededor del orden de 10 µM. Finalmente a partir de una solución de incubación de 100 µM, se observa un aumento exponencial en la

captación de serotonina, posiblemente debido al colapso de los mecanismos de acumulación plaquetarios y/o de la acumulación inespecífica de serotonina en otros compartimentos celulares. Se han estimado unos datos de concentración basal de serotonina normalizada frente a la concentración de proteína plaquetaria total de entorno a 25-50 nmol/g ($47,59 \pm 23,66$ nmol/g; media \pm desviación estándar).

3. LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN PLAQUETAS

Otro apartado principal a evaluar en el presente trabajo ha sido el estudio de la liberación de serotonina por parte de las plaquetas frente a diversos estímulos. Según nuestra hipótesis, una desregulación de los mecanismos de captación y acumulación vesicular de DA en neuronas de pacientes parkinsonianos, podría conllevar a la deficiencia de DA liberada durante la actividad sináptica. La consecuente acumulación de DA y sus metabolitos en el citosol desencadenarían posteriores procesos de degeneración neuronal (Zucca et al., 2017). Dicha desregulación de estos mecanismos se vería reflejada por su equivalente en serotonina de muestras plaquetarias. Para ello se han empleado las herramientas de determinación de catecoles e indoles por amperometría tanto en experimentos en célula única como en población celular.

Mediante amperometría en célula única se ha determinado la concentración de serotonina del conjunto de eventos exocitóticos en plaquetas de pacientes control. Dicha determinación se ha realizado frente a los estímulos de Ca^{2+} e ionomicina $10\mu\text{M}$, y frente a trombina $4\text{uds}/\text{mL}$. La ionomicina es un ionóforo de Ca^{2+} que permite el transporte de dicho ión entre los diferentes compartimentos celulares a favor de gradiente electroquímico. Por su parte, la trombina se trata de un estímulo más fisiológico, que desencadena el proceso de activación plaquetaria. Ambos estímulos conllevan una liberación del contenido tanto de gránulos α como gránulos densos de plaquetas, siendo estos últimos los responsables de la acumulación vesicular de serotonina (Fitch-Tewfik & Flaumenhaft; 2013). En la siguiente figura (**Fig. 11**), se puede observar un ejemplo representativo de registro amperométrico en célula única de paciente control.

En todos los casos las muestras han sido incubadas previamente con serotonina $10\mu\text{M}$ durante 2 h con el fin de aumentar la probabilidad de monitorización de los eventos exocitóticos. De hecho, se debe destacar que, bajo nuestras condiciones, y así como han documentado otros autores (Ge et al; 2010), la determinación de serotonina en plaqueta única sin incubar resulta tediosa, debido, principalmente, a no poder discriminar los

eventos excitósicos del ruido de medida. Mediante la estimulación con ionomicina se han conseguido unos registros preliminares de serotonina liberada que corresponden a una carga en torno a 0,2 pC ($0,27\pm 0,21$ pC), mientras que en el caso de la estimulación con trombina ha sido en torno a 0,5 pC ($0,55\pm 0,18$ pC). La explicación de la diferencia de resultados existente entre estos dos estímulos es desconocida, pero posiblemente se deba a la propia fisiología del estímulo. No obstante, se deben realizar más experimentos de este tipo con el fin de generar datos más robustos que lo confirmen.

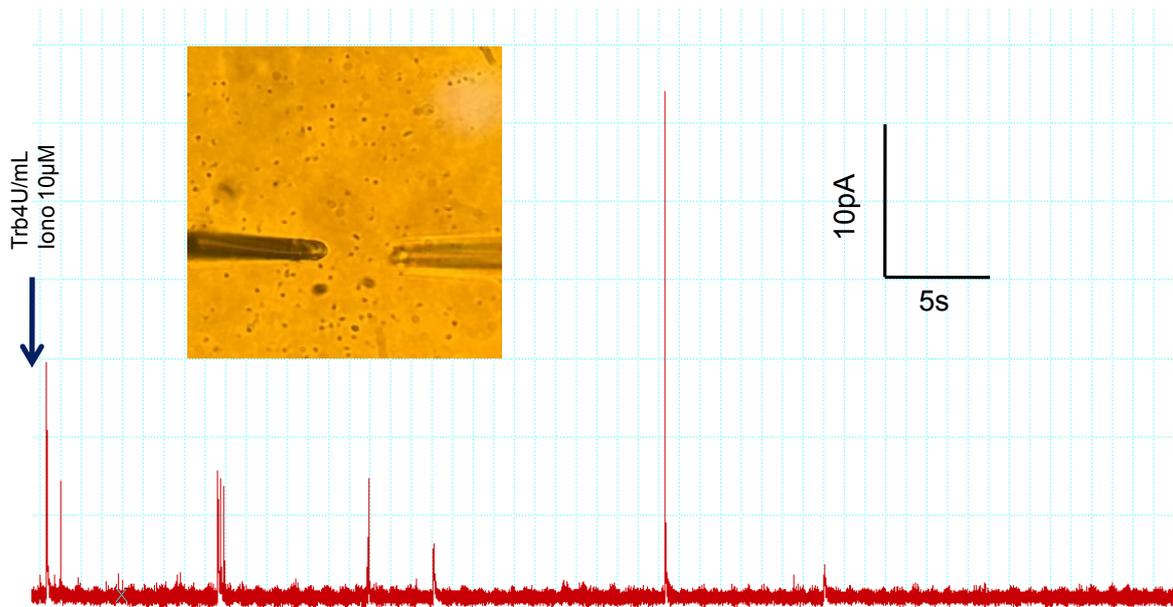


Fig. 11. Registro amperométrico en célula única. Los registros amperométricos de plaqueta única han sido realizados de acuerdo a lo mencionado previamente en la sección de Material y Métodos.

Tal y como se expuso con anterioridad, las plaquetas poseen un número finito de gránulos de secreción en un rango de 3 a 8 gránulos por plaqueta. Este hecho, junto a la dificultad intrínseca de realizar registros de amperometría en plaqueta única, conllevan a una limitación instrumental de este tipo de estudio. Por ello, se ha querido determinar la liberación de serotonina en población celular de plaquetas.

Los registros de liberación de serotonina en población plaquetaria se han realizado mediante la estimulación con trombina 4uds/ mL perfundida durante 10 s. En este caso, y como se puede observar en el siguiente registro, las plaquetas sin incubar previamente con serotonina son capaces de generar una señal apreciable correspondiente a la liberación de serotonina de en torno a 100 nC ($97,77\pm 25,79$ nC) por cada 1×10^6 plaquetas. Por su parte, la incubación previa con serotonina aumentó consecuentemente la posterior liberación de esta amina biógena, con una concentración traducida en carga de en torno a 300 nC

($302,23 \pm 79,7$ nC). Estos resultados permiten deducir que la acumulación de serotonina en plaquetas se da de forma mayoritaria en los gránulos de secreción de las mismas.

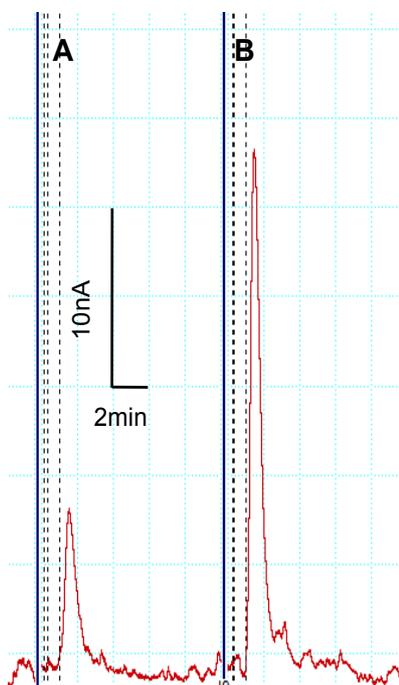


Fig. 12. Registro amperométrico en población celular. Los registros amperométricos de población de plaquetas han sido realizados de acuerdo a lo mencionado previamente en la sección de Material y Métodos. Las plaquetas fueron estimuladas con trombina 4uds/ mL sin incubación previa (panel A), o bien con incubación de serotonina 10 μ M 2 h antes de realizar el experimento.

La ventaja de realizar determinación de catecoles e indoles liberados en población celular frente a los registros en célula única radica en que esta nos permite evaluar con mayor precisión pequeñas variaciones en los mecanismos de captación y acumulación de aminas biógenas y, por tanto, de su liberación. En el caso de la EP, puede constituir una herramienta más útil para un futuro diagnóstico precoz de la misma.

4. PERSPECTIVAS

Las plaquetas son las células secretoras más fácilmente accesibles y con menos problemas éticos para su obtención en el humano. Dadas las similitudes entre la maquinaria secretora de las plaquetas y el resto de células secretoras, incluidas las neuronas, estamos realizando este trabajo de caracterización funcional de la acumulación y liberación de serotonina como posible método de diagnóstico de enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas. Pese a que se requieren investigaciones posteriores, el uso de las herramientas amperométricas descritas en el presente trabajo, establecen un interesante punto de partida para el diagnóstico de dichas enfermedades.

CONCLUSIONES

Según lo comentado en el presente trabajo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Utilizando un **volumen relativamente pequeño de sangre**, se puede extraer una cantidad importante de plaquetas humanas, suficiente para la investigación del proceso secretor.
2. Se ha logrado una **purificación de plaquetas superior al 90%**, además de su **mantenimiento** durante varios días en condiciones funcionales óptimas.
3. Las plaquetas aisladas mediante este procedimiento son capaces de **captar** serotonina, L-DOPA y 5-OH triptófano, pero **carecen de mecanismos para transformar** la L-DOPA en dopamina y la 5-OH triptófano en serotonina, al carecer de la enzima AAAD.
4. Las plaquetas liberan serotonina por un mecanismo de **exocitosis** que puede ser monitorizado mediante amperometría, bien en poblaciones plaquetarias o bien en plaqueta única.
5. La caracterización funcional de la vía secretora en plaquetas humanas abre muchas **posibilidades diagnósticas** de enfermedades que tengan que ver con alteraciones en esta ruta.

BIBLIOGRAFÍA

Aleksovski, B., Novotni, A., Vujović, V., Rendeovski, V., Manusheva, N., Neceva, V., Gjorgoski, I. (2017). Evaluation of peripheral serotonin content and α_2 -adrenergic receptor function as potential markers for life-long recurrent depressive disorder by using methodological improvements. *International J Psychiat Clin Pract*, 1-10.

Bisaglia, M., Mammi, S., Bubacco, L. (2007). Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine. *J Biol Chem*, **282**, 15597-15605.

Bisaglia, M., Mammi, S., Bubacco, L. (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein. *FASEB J*, **23**, 329-340.

Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177–189.

Brunk, I., Hölte, M., Jagow, B. V., Winter, S., Sternberg, J., Blex, C., Pahner I, Ahnert-Hilger, G. (2006). Regulation of vesicular monoamine and glutamate transporters by vesicle-associated trimeric G proteins: new jobs for long-known signal transduction molecules. neurotransmitter transporters. *Handbook Exp Pharmacol*, **175**, 305-325.

Costa-Filho, R. C., Bozza, F. A. (2017). Platelets: An outlook from biology through evidence-based achievements in critical care. *Ann Translat Med*, Nov;5(22), 449-449.

Deupree, J., Smith, S., Kratochvil, C., Bohac, D., Ellis, C., Polaha, J., Bylund, D. (2006). Possible involvement of alpha-2A adrenergic receptors in attention deficit hyperactivity disorder: Radioligand binding and polymorphism studies. *Am J Medical GenPart B: Neuropsych Gen*, **141B**, 877-884.

Fitch-Tewfik, J. L., Flaumenhaft, R. (2013). Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front Endoc.* **4**, Jun 26;4:77

Ge, S., White, J. G., Haynes, C. L. (2009). Quantal release of serotonin from platelets. *Analyt Chem*, **81**, 2935-2943.

Ge, S., White, J. G., Haynes, C. L. (2010). Critical role of membrane cholesterol in exocytosis revealed by single platelet study. *ACS Chem. Biol.* **5**, 819–828.

Ge, S., Woo, E., White, J. G., Haynes, C. L. (2011). Electrochemical measurement of endogenous serotonin release from human blood platelets. *Analyt Chem*, **83**, 2598-2604.

Henry, A. G., Aghamohammadzadeh, S., Samaroo, H., Chen, Y., Mou, K., Needle, E., Hirst, W. D. (2015). Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Hum Mol Gen*, **24**, 6013-6028.

Hornsey, V. S., Mccoll, K., Drummond, O., Mcmillan, L., Morrison, A., Morrison, L., Prowse, C. V. (2006). Extended storage of platelets in SSP platelet additive solution. *Vox Sanguinis*, **91**, 41-46.

Isolation of human platelets from whole blood. (2018, March 02). Retrieved March 02, 2018, from <http://www.abcam.com/protocols/isolation-of-human-platelets-from-whole-blood>

Johnson, L., Schubert, P., Tan, S., Devine, D. V., Marks, D. C. (2015). Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*, **56**, 360-368.

Kalia, L. V., Lang, A. E. (2015). Parkinsons disease. *Lancet*, **386**, 896-912.

Machado, D. J., Montesinos, M. S., Borges, R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol. Exocytosis and Endocytosis*, **440**, 297-313.

Polymeropoulos, M. H. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinsons Disease. *Science*, **276**, 2045-2047.

Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. (2014). The prevalence of Parkinson's Disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* **29**, 1583–90.

Salignac, S., Latger-Cannard, V., Schlegel, N., Lecompte, T. P. (2013). Platelet counting. *Haemostatic Methods Mol Biol*. **992**, 193-205.

Sharda, A., Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000Research*, **7**, 236-236.

Soto, C. (2012). Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell*, **149**, 968-977.

Zhen Qi, Gary W. Miller, Eberhard O. Voit (2008). Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism. *PLoS ONE* **3**, e2444.

Zucca, F. A., Segura-Aguilar, J., Ferrari, E., Muñoz, P., Paris, I., Sulzer, D., Zecca, L. (2017). Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinsons disease. *Prog Neurobiol*, **155**, 96-119.

ANEXOS

	Serotonina (uM) (en rojo la Serotonina 10mM que añadir a la solución 1mM)											SSP+ Asc. 200uM				
	1000,000	333,333	100,000	33,333	10,000	3,333	1,000	0,333	0,100	0,033	0,010	0,003	0,000	Total (ul)	SSP+ (ul)	Asc. 10mM (ul)
1 muestra	SSP+ Asc.200uM (ul)	586	1351	100,000	33,333	10,000	3,333	1,000	0,333	0,100	0,033	0,010	0,003	8061		
	Sol. Anterior (ul)	389	579	1351	279	538	144	133	140	120	100	100	100	7900		
	Total (ul)	1943	879	1929	838	1794	433	444	432	440	400	300	300	161		
	Total Final (ul)						300									
2 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	1367	3151	1304	2931	2931	674	725	672	719	653	653	467	18143		
	Sol. Anterior (ul)	907	684	1351	652	1256	337	311	336	308	327	280	233	17780		
	Total (ul)	4534	2051	4502	1956	4187	1011	1036	1008	1027	980	933	700	363		
	Total Final (ul)						700 (600)									
3 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	2148	4952	2049	4606	4606	1059	1140	1056	1129	1027	1027	733	28225		
	Sol. Anterior (ul)	1425	1074	2122	1025	1974	529	488	528	484	513	440	367	27661		
	Total (ul)	7124	3222	7075	3074	6579	1588	1628	1584	1613	1540	1467	1100	565		
	Total Final (ul)						1100 (900)									
4 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	2929	6753	2794	6280	6280	1444	1554	1440	1540	1400	1400	1000	38307		
	Sol. Anterior (ul)	1943	1465	2894	1397	2692	722	666	720	660	700	600	500	37541		
	Total (ul)	9715	4394	9647	4192	8972	2166	2220	2160	2200	2100	2000	1500	766		
	Total Final (ul)						1500 (1200)									
5 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	3515	8104	3353	7536	7536	1733	1865	1728	1848	1680	1680	1200	45868		
	Sol. Anterior (ul)	2332	1758	3473	1677	3230	866	799	864	792	840	720	600	44951		
	Total (ul)	11658	5273	11577	5030	10766	2599	2664	2592	2640	2520	2400	1800	917		
	Total Final (ul)						1800 (1500)									
10 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	6835	15757	6520	14654	14654	3369	3626	3360	3593	3267	3267	2333	89216		
	Sol. Anterior (ul)	4534	3418	6753	3260	6280	1885	1554	1680	1540	1633	1400	1167	87432		
	Total (ul)	22668	10253	22510	9780	20935	5054	5180	5040	5133	4900	4667	3500	1784		
	Total Final (ul)						3500 (3000)									
20 muestras	SSP+ Asc.200uM (ul)	13671	31514	13041	29309	29309	6739	7252	6720	7187	6533	6533	4667	178433		
	Sol. Anterior (ul)	9067	6835	13506	6520	12561	3369	3108	3360	3080	3267	2800	2333	174864		
	Total (ul)	45335	20506	45020	19561	41869	10108	10360	10080	10267	9800	9333	7000	3569		
	Total Final (ul)						7000 (6000)									

Anexo 01. Tabla de dilución de la serotonina. Se adjuntan las diferentes concentraciones de las soluciones de incubación empleadas tanto para las muestras de captación como de liberación.