

Universidad  
de La Laguna

---

# DISFUNCIÓN EN LOS GRÁNULOS DENSOS PLAQUETARIOS HUMANOS COMO POSIBLE MARCADOR PRECLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

---

**Trabajo de Fin de Grado**

Departamento de Medicina Física y Farmacología

Sección de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad de La Laguna

Hospital Universitario de Canarias (HUC)

2021/2022

**Autora:**

Karina M<sup>a</sup> Morales Megret

**Tutores:**

Pablo Manuel Montenegro Escudero

Mercedes Pueyo Morlans







---

# ÍNDICE

---

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
1. Enfermedad de Parkinson .....	5
1.1. Cambios anatómicos .....	5
1.2. Cambios a nivel de los neurotransmisores .....	6
1.2.1. Dopamina .....	6
1.2.2. Otros neurotransmisores implicados .....	9
1.3. Diagnóstico .....	9
1.3.1. Síntomas motores y no motores .....	9
1.3.2. Diagnóstico diferencial de la enfermedad de Parkinson .....	11
1.4. Tratamiento farmacológico .....	11
2. Plaquetas como modelo neuronal .....	12
OBJETIVOS .....	15
MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
1. Análisis general .....	21
2. Análisis de serotonina en plaquetas .....	21
2.1. Procedencia de las plaquetas, criterios de inclusión y exclusión .....	21
2.2. Aislamiento y mantenimiento de plaquetas .....	21
2.3. Normalización del número de plaquetas .....	22
2.4. Experimentos de captación y liberación .....	23
2.5. Determinación de la concentración de serotonina y proteínas .....	24
2.6. Análisis y estadística de los resultados .....	25
2.7. Materiales y reactivos .....	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1. Establecimiento de criterios de selección de voluntarios.....	29
2. Análisis del contenido basal de serotonina en plaquetas.....	31
3. Análisis de la captación total de serotonina en plaquetas.....	32
4. Análisis de captación de serotonina en gránulos densos plaquetarios.....	34
5. Establecimiento de nuevos umbrales .....	37
6. Análisis de la liberación de serotonina en gránulos densos plaquetarios.....	37
CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG?.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	49

---

# RESUMEN

---

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa cuyo diagnóstico sigue siendo clínico, evidenciándose a través de sus manifestaciones clínicas, cuando ya ha ocurrido una gran destrucción neuronal.

La dopamina (DA) es el principal neurotransmisor involucrado en la patogénesis de la EP y su déficit es la principal causa de sus síntomas y signos. Sus principales metabolitos, el DOPAC y especialmente el DOPAL, son extremadamente tóxicos y, por tanto, deben ser almacenados en el interior de las vesículas secretoras (VS) de las neuronas dopaminérgicas. Se ha observado que tanto las VS de estas neuronas como los gránulos densos de las plaquetas comparten mecanismos similares de acumulación de aminas biógenas: DA y serotonina (5-HT), respectivamente. Estudiar la capacidad de captación, acumulación y liberación de 5-HT en plaquetas de sangre periférica podría correlacionarse con lo que sucede a nivel central en las neuronas dopaminérgicas.

Este trabajo se ha centrado en dichas tareas, reconvocando para ello a voluntarios sanos con análisis de 5-HT en plaquetas alterado que participaron entre 2019 y 2021 en el estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio, además de reclutar a otros nuevos voluntarios, tanto clínicamente sanos como a pacientes con EP. Posteriormente, se realizaron diferentes experimentos de captación y liberación de 5-HT en el laboratorio para estudiar el comportamiento de la 5-HT en estos contextos y compararlos con pacientes con EP. Así, a través de los citados ensayos podrían encontrarse marcadores preclínicos de la EP, constituyendo el análisis funcional de 5-HT en plaquetas un método de diagnóstico precoz de esta enfermedad.

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

---

# ABSTRACT

---

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease whose diagnosis remains clinical, evidenced by its clinical manifestations, when a great neuronal destruction has already occurred.

Dopamine (DA) is the main neurotransmitter involved in the pathogenesis of PD and its deficiency is the main cause of its symptoms and signs. Its main metabolites, DOPAC and especially DOPAL, are extremely toxic and, therefore, must be stored inside the secretory vesicles (VS) of dopaminergic neurons. It has been observed that both the VS of these neurons and the dense granules of platelets share similar mechanisms for the accumulation of biogenic amines: DA and serotonin (5-HT), respectively. Studying the uptake, accumulation and release capacity of 5-HT in peripheral blood platelets could be correlated with what happens centrally in dopaminergic neurons.

This work has focused on these tasks, reconvening healthy volunteers with altered platelet 5-HT analysis who participated between 2019 and 2021 in the study carried out by our laboratory and also recruiting other new volunteers, both clinically healthy and patients with PD. Subsequently, different 5-HT uptake and release experiments were performed in the laboratory to study the behavior of 5-HT in these contexts and compare them with patients with PD. Thus, through the aforementioned tests, preclinical markers of PD could be found, constituting the functional analysis of 5-HT in platelets a method of early diagnosis of this disease.

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



---

# INTRODUCCIÓN

---



# 1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después de la enfermedad de Alzheimer. Es un proceso crónico y progresivo provocado por una degeneración neuronal en la sustancia negra, lo que conlleva una disminución en los niveles de dopamina y la consecuente aparición de síntomas motores. Se ha observado que la neurodegeneración comienza antes de que estos se manifiesten, adquiriendo de esta manera especial importancia los llamados síntomas no motores (SNM), que suelen preceder a los SM o bien acompañarlos y que producen manifestaciones tanto a nivel cerebral como extracerebral (Sociedad Española de Neurología, 2019).

En cuanto a su etiopatogenia esta sigue siendo desconocida, pero probablemente sea multifactorial. La prevalencia es de aproximadamente un 0,3% en la población general, llegando al 2% en mayores de 60 años y siendo superior al 4% en mayores de 80, siendo la edad un importante factor de riesgo para su desarrollo (Sociedad Española de Neurología, 2019). Así, la edad media de aparición de la enfermedad es alrededor de los 60 años y afecta más frecuentemente a varones (Lee, A., & Gilbert, R. M., 2016). Otro aspecto de interés son los factores genéticos, especialmente en aquellos que debutan con la enfermedad por debajo de los 45 años y que presentan historia familiar. En este aspecto, han pasado muchos años desde la descripción de la primera mutación genética relacionada con la EP, afectando a la  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -SN) y desde entonces se han descrito 22 mutaciones asociadas que podrían explicar hasta un 30% de las formas familiares y un 5% de las esporádicas (Sociedad Española de Neurología, 2019).

## 1.1. Cambios anatómicos

Si bien la afectación con la que más se asocia a la enfermedad de Parkinson (EP) es la que se produce en la *pars compacta* de la sustancia negra mesencefálica, también se afectan el locus coeruleus, los ganglios basales (cuerpo estriado, compuesto por el núcleo caudado y el núcleo lenticular, compuesto a su vez por el globo pálido y el putamen; el claustró; el núcleo amigdalino y el núcleo accumbens), el cerebelo, el tálamo e hipotálamo, el sistema límbico e incluso las células gliales o el volumen cerebral (Lotankar, S. et al., 2017).

Otra característica de la EP es la presencia de inclusiones neuronales llamadas “cuerpos de Lewy” (CL), fundamentalmente, compuestos por  $\alpha$ -SN. Esta es una proteína relativamente pequeña (14 kDa) que se expresa en el cerebro en las terminales presinápticas y que actúa como moduladora de la estabilidad de la membrana neuronal, interviniendo en las señales presinápticas y el tráfico de sustancias a través de dicha membrana (Atik et al., 2016). Aunque la  $\alpha$ -SN es una proteína intracelular, también se ha encontrado en otros fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo, la sangre o el plasma (Stefanis L., 2012). Por otro lado, cabe destacar que no es patognomónica de la EP, ya que además se ha encontrado en la atrofia multisistémica, la demencia con CL, algunos casos de enfermedad de Alzheimer, la neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (anteriormente llamada síndrome o enfermedad de Hallervorden-Spatz) tipo I (Stefanis L., 2012), el fallo autonómico puro (Atik et al., 2016) e incluso en un subtipo de temblor esencial (Kahle P. J., 2008).

La  $\alpha$ -SN contribuye en la patogénesis de la EP a través de diferentes vías, pero se cree que es su conformación soluble oligomérica aberrante la que produce alteraciones en la homeostasis celular y muerte neuronal mediante efectos a nivel intracelular y de las sinapsis (Stefanis L., 2012). Braak y colaboradores en 2003, estudiaron la presencia de esta  $\alpha$ -SN en un elevado número de autopsias de pacientes con EP para clasificar por estadios la enfermedad. Se trata de una clasificación basada en hallazgos neuropatológicos, con 6 estadios secuenciales y aditivos ante la presencia de estos depósitos de  $\alpha$ -SN y que sigue un curso ascendente empezando primero en el bulbo olfatorio y acabando en áreas corticales. A continuación se resumen los 6 estadios de Braak:

- Estadio 1 de Braak: se afectan el bulbo olfatorio, el núcleo motor del vago y el plexo mientérico.
- Estadio 2 de Braak: se afectan el complejo coeruleus/ subceruleus (CSC), el núcleo magnocelular y el núcleo posterior del rafe. La depresión en el paciente con EP puede ser explicada en base a la disfunción de CSC y sus aferencias serotoninérgicas procedentes del núcleo del rafe caudal, asumiendo de esta manera que la depresión en la EP tiene una base serotoninérgica. La enfermedad en el CSC y núcleos reticulares también forma parte de los trastornos del sueño en la EP.
- Estadio 3 de Braak: se afectan las pars compacta de la SN, la pars compacta del núcleo pedúnculo pontino y el subnúcleo central de la amígdala. Al mismo tiempo, se empiezan a formar CL en los núcleos magnocelular, septal medial, intersticial de la banda diagonal de Broca, colinérgico basal de Meynert e histaminérgico tuberomamilar.
- Estadio 4 de Braak: se afectan el núcleo intersticial de la estría terminalis, el núcleo accesorio cortical y basolateral de la amígdala, el claustró ventral, el núcleo intralaminar del tálamo, el sector CA2 del cuerpo de Ammon y la corteza temporal anteromedial. En este estadio es difícil predecir una correlación clínica.
- Estadio 5 de Braak: se afectan la corteza prefrontal y áreas de asociación sensorial terciarias.
- Estadio 6 de Braak: se afectan el área primarias motora, el área premotora y las áreas primarias somatosensoriales, donde ya se han extendido ampliamente los CL.

Aunque el modelo descrito anteriormente se correlaciona cronológicamente con la mayor parte de los síntomas de la enfermedad, debe mencionarse que en un estudio realizado por M. E. Kalaitzakis y colaboradores en 2008 con 71 pacientes con EP mostró que solo el 53% de ellos mostraron la distribución ascendente, caudo-rostral propuesta por Braak.

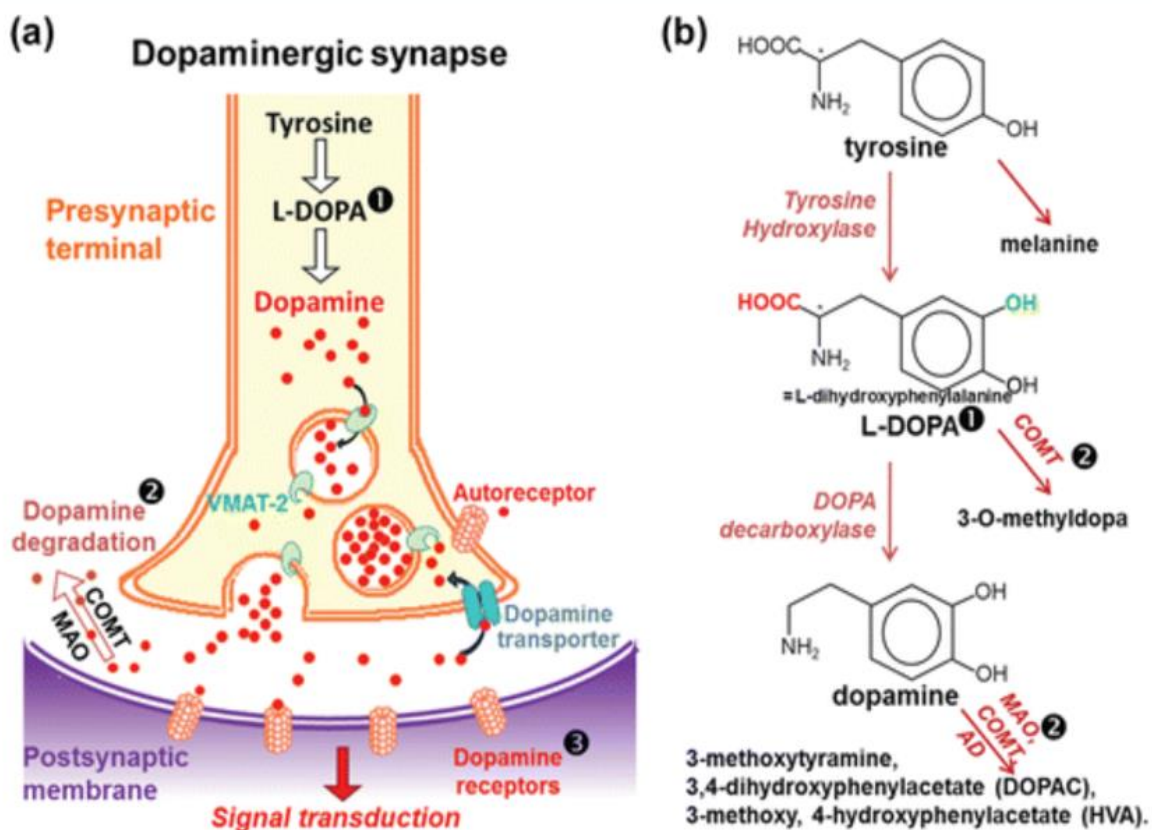
## 1.2. Cambios a nivel de los neurotransmisores

### 1.2.1. *Dopamina*

En la EP, los signos y síntomas motores comienzan a ser evidentes cuando se produce una pérdida de en torno a un 70% de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra y una depleción de al menos un 80% de la dopamina estriatal (Reeve, A.K., Grady, J.P., Cosgrave, E.M. et al., 2018). Así, la DA es el principal neurotransmisor relacionado con la patogénesis de la EP. Esta pertenece a la familia de las catecolaminas y no solamente es sintetizada a nivel central por las neuronas de la *pars compacta* de la SN, el área tegmental ventral mesencefálica y el núcleo arcuato

del hipotálamo, sino también en la segunda neurona del sistema simpático y la médula de las glándulas suprarrenales (Seeman, 2009). La DA (**Fig. 01**) se produce por la hidroxilación de aminoácidos L-tirosina a L-DOPA mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y su posterior descarboxilación a DA mediante la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AAAD) o también llamada dopa-decarboxilasa (DDC). Seguidamente, la DA se introduce en vesículas secretoras (VS) gracias a la acción del transportador vesicular de monoaminas (VMAT<sub>2</sub>) liberándose en respuesta a estímulos presinápticos (Zhen Qi et al., 2008). Tras la exocitosis de las VS, la DA se une a sus receptores en la membrana post-sináptica, desencadenando la transducción de señales en las neuronas post-sinápticas (Jones, D. R., Moussaud, S., & McLean, P., 2014).

**Fig. 01| Sinapsis y metabolismo dopaminérgico**

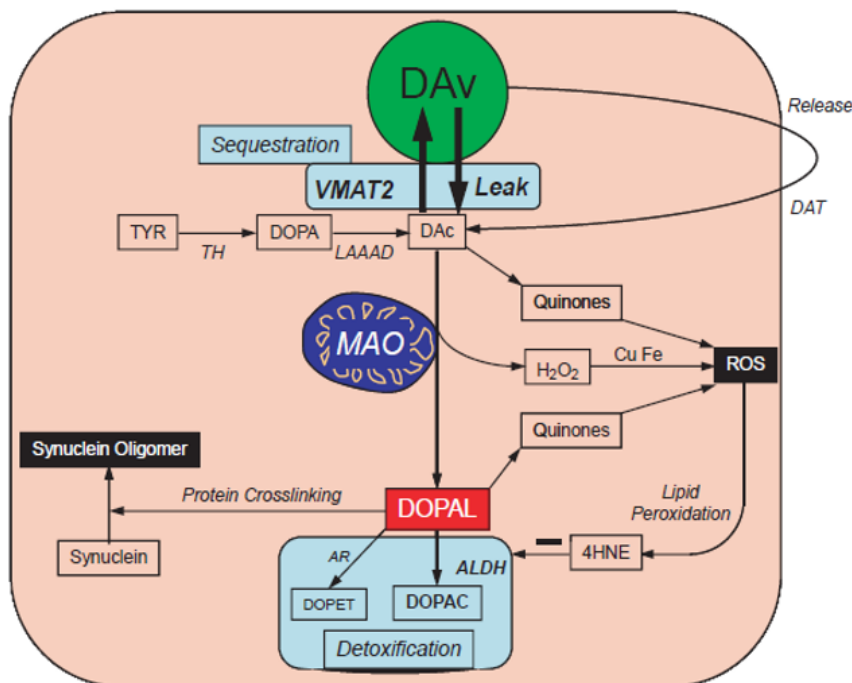


Original de Jones, D. R., Moussaud, S., & McLean, P. (2014)

La DA en la hendidura sináptica es reciclada a través de su recaptación por el transportador de DA en las terminales presinápticas siendo catabolizada en el citosol celular por las enzimas monoamino oxidasa B (MAO-B), aldehído deshidrogenasa (AD) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Jones, D. R., Moussaud, S., & McLean, P., 2014). De esta forma se generan los metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacetato (DOPAC), 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) y 3-metoxitiramina (3-MT), además del ácido homovalínico (HVA) que carece de actividad biológica (Eisenhofer G. et al., 2004).

Una de las hipótesis sobre el origen patológico de la EP es la teoría aminérgica. Esta teoría expone que las catecolaminas y sus metabolitos actúan como neurotoxinas endógenas, en este caso la DA y su principales metabolitos, el DOPAL y el DOPAC (Bisaglia et al., 2007; Goldstein DS, et al., 2013; Zucca et al., 2017), debiendo almacenarse correctamente en las VS para evitar la muerte de las neuronas. En la **Fig.02**, se observa cómo la acción de la MAO sobre la DA citosólica produce el DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldehído). El DOPAL es detoxificado principalmente por la aldehído deshidrogenasa (ALDH), para formar el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET), un metabolito menor formado a través de la aldehído/aldosa reductasa (AR). Tanto DA citosólica como DOPAL (y, al menos teóricamente, DOPAC y DOPET) se autooxidan espontáneamente a quinonas, lo que aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas producen peroxidación lipídica, obteniendo como metabolito al 4-hidroxinonenal (4HNE), que inhibe la ALDH y, por tanto, induciría un aumento de DOPAL en las neuronas dopaminérgicas. Además, el DOPAL es capaz de entrecruzarse con proteínas, aumentando la oligomerización de la  $\alpha$ -SN, y esta como se ha mencionado anteriormente, está implicada en la patogenia de la EP (Goldstein DS, et al., 2013).

**Fig. 02| Origen y destinos metabólicos del DOPAL en las neuronas dopaminérgicas**



En condiciones de reposo, la mayor parte pérdidas irreversibles de la dopamina (DA) de las neuronas se debe a la fuga pasiva (Leak) de vesículas (DAv) al citosol (DAc), seguida de su deaminación enzimática catalizada por monoaminoxidasa (MAO). La DA citosólica se incorpora a las vesículas a través del transportador de monoaminas vesicular tipo 2 (VMAT2). Por otro lado, la liberación de DA de las vesículas al citosol por exocitosis y su recaptación a través del transportador de DA (DAT) constituyen solo una pequeña parte en el proceso de recambio de DA. La pérdida de DA se equilibra con la biosíntesis de catecolaminas en curso a partir de la acción de la L-aroamínico-aminoácido descarboxilasa (LAAAD) sobre la DOPA producida a partir de la tirosina (TYR) gracias a la acción de la tirosina hidroxilasa (TH). La MAO sobre la DAc produce el DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldehído), que posteriormente es detoxificado por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) para formar ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET). El DOPAL es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y a través del entrecruzamiento con proteínas, producir oligómeros de alfasinucleína. Original de Goldstein DS, et al. (2013).

### 1.2.2. Otros neurotransmisores implicados

Otros neurotransmisores tales como la acetilcolina (ACh), el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y el glutamato también tienen un papel importante en la patogénesis de la EP: en el sistema extrapiramidal de pacientes con EP se produce un desequilibrio de estos neurotransmisores, encontrándose además de un déficit de DA, un déficit de GABA y un exceso de ACh y glutamato (Lotankar, S. et al., 2017). Por último, cabe mencionar a la serotonina (5-HT), donde la evidencia en estudios animales, bioquímicos, *post-mortem* y humanos *in vivo* ha demostrado una pérdida estriatal y extraestriatal de 5-HT a medida que va evolucionando la EP (Politis M., Niccolini F., 2015).

## 1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la EP es fundamentalmente clínico, precisando revisiones periódicas para su confirmación y para descartar, en caso de aparición de síntomas atípicos, la posibilidad de algún otro tipo de parkinsonismo neurodegenerativo. En este aspecto, adquiere cada vez mayor interés la investigación de biomarcadores que faciliten el diagnóstico en fases precoces de la enfermedad. Por otro lado, también se pueden utilizar pruebas complementarias en caso de dudas diagnósticas (nivel de evidencia A) como el estudio del déficit olfatorio, la gammagrafía cardiaca con  $^{123}\text{I}$ -MIBG (yodo 123-metayodobencilguanidina) y los estudios de neuroimagen funcional de la vía dopaminérgica presináptica con PET (tomografía por emisión de positrones) o SPECT (tomografía por emisión de fotón único) con DaT-SCAN (Sociedad Española de Neurología, 2019). El DaT-SCAN es una solución inyectable que contiene el principio activo ioflupano marcado con  $\text{I}^{123}$  (European Medicines Agency, 2022). Este es capaz de distinguir la EP de entidades que se asemejan a una EP sin parkinsonismo (temblor esencial), pero no son una herramienta cualificada para diferenciar la EP de otros parkinsonismos (nivel de evidencia A) (Sociedad Española de Neurología, 2019).

### 1.3.1. Síntomas motores y no motores

En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se recogen los síntomas motores y los principales síntomas no motores (SNM) de la enfermedad de Parkinson (Sociedad Española de Neurología, 2019; Ronald F. Pfeiffer, 2016).

Tabla 1  Principales síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson		
Síntomas motores	Síntomas no motores	
Bradicinesia	Alteraciones sensoriales	Anosmia/hiposmia
		Síntomas visuales: alteración en la discriminación de colores, insuficiencia en la convergencia ocular y el síndrome de ojo seco
		Dolor musculoesquelético
Temblor de reposo	Cambios conductuales	Depresión, ansiedad, demencia
Rigidez muscular	Disfunción autonómica	Hipotensión ortostática; a nivel gastrointestinal: disfagia, gastroparesia, sobrecrecimiento bacteriano, estreñimiento; síntomas de tracto urinario inferior (polaquiuria, nicturia, incontinencia urinaria de urgencia), a nivel sexual: disfunción eréctil, eyaculación precoz, dificultad para alcanzar el orgasmo; hipersudoración
Inestabilidad postural	Alteraciones del sueño	Insomnio (fragmentación del sueño), alteraciones del sueño REM

Síntomas motores según la Sociedad Española de Neurología, 2019. Síntomas no motores según Ronald F. Pfeiffer, 2016.

Los SNM son frecuentes, pueden preceder el desarrollo de los síntomas motores en incluso años o décadas y tener más impacto sobre la calidad de vida de los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) que los propios síntomas motores (Ronald F. Pfeiffer, 2016). De hecho, en un estudio reciente (Hye-Suk Kim et al., 2013), se registró al menos un SNM en casi el 100% de los pacientes y en otro (S. Krishnan et al., 2011), los SNM estuvieron presentes en el 100% de los pacientes que además presentaban SM. Es importante destacar que los SNM también se pueden encontrar en sujetos sin EP como parte normal del proceso de envejecimiento: el 68-88% presentan al menos un SNM, por lo que se debe ser cauto a la hora de atribuir todos los SNM descritos a la EP en sí misma (Ronald F. Pfeiffer, 2016). Sin embargo, estos pacientes suelen tener un mayor número y diferentes SNM en comparación con controles sanos (8,4 vs. 2,8 en un estudio (T.K. Khoo et al., 2013) y estos suelen ser más frecuentes y severos. Por otro lado, los SNM pueden ser el debut de la enfermedad en hasta un 20% de los casos. En estas circunstancias el diagnóstico tiende a retrasarse, derivando a los pacientes a diferentes especialidades y recibiendo un tratamiento inadecuado (Ronald F. Pfeiffer, 2016).

En cuanto a las alteraciones sensoriales, la pérdida del olfato está presente en más del 90% de los pacientes con EP, a menudo ya objetivándose en el momento del diagnóstico, aunque más del 70% no es consciente de ello (Richard L. Doty et al., 2012). Algunos investigadores sostienen que esta es independiente de la etapa y duración de la enfermedad (Richard L. Doty et al., 2012), otros que se asocia con mayor severidad y progresión más rápida y que la hiposmia severa en estos pacientes puede predecir el desarrollo de demencia (Casjens S. et al., 2013). La especificidad y sensibilidad de este síntoma para detectar estadios tempranos de la EP en pacientes menores de 60 años es del 91% y 88% respectivamente (Morales-Briceño, H. et al., 2011).

De los cambios conductuales, la depresión es uno de los más frecuentes, puede ocurrir en cualquier momento en el curso de la enfermedad. Estudios prospectivos de depresión en pacientes con EP indican que esta precede al diagnóstico unos 2-10 años (Tolosa, E., Compta, Y., & Gaig, C., 2007) y aquellos que la desarrollan en estadios precoces tienen un riesgo aumentado de alteraciones motoras y discapacidad (Ronald F. Pfeiffer, 2016). También cabe mencionar la demencia, que aparece en más del 80% de los pacientes con EP que viven más de 20 años desde el diagnóstico de la enfermedad (Hely, M. A. et al., 2008).

La disfunción autonómica es común y puede ocurrir en cualquier estadio de la enfermedad. La hipotensión ortostática es la más reconocida, dándose en casi el 60% de los pacientes, aunque sólo una pequeña parte de estos serán sintomáticos. En relación a la disfunción gastrointestinal, la disfagia puede ser responsable de complicaciones mayores como la broncoaspiración de contenido orofaríngeo, y con ella, de posibles infecciones respiratorias y neumonías aspirativas. En cuanto a la gastroparesia, aparte de la clínica (saciedad precoz, anorexia, distensión abdominal, náuseas, vómitos y pérdida de peso progresiva), puede causar alteraciones en la absorción de la L-DOPA, dado que esta debe alcanzar el intestino delgado para ser correctamente absorbida (Ronald F. Pfeiffer, 2016).



Finalmente, las alteraciones del sueño tienen una prevalencia cercana al 90% (Kurtis, M. M, et al., 2013). Entre ellas se encuentra el insomnio, siendo su forma más frecuente la llamada fragmentación del sueño, cuya base es multifactorial y se ha relacionado con la rigidez nocturna y la bradicinesia, la nicturia o con los efectos de la medicación (Ronald F. Pfeiffer, 2016). También se deben mencionar las alteraciones del sueño REM, caracterizadas por la presencia de sueños vívidos, somnolientos o movimientos exagerados de las extremidades durante el sueño. Las alteraciones del sueño REM pueden ser tanto una manifestación de la EP (no se sabe con certeza su prevalencia, pero puede estar en torno al 25-50%) como un factor de riesgo para desarrollarla (Ronald F. Pfeiffer, 2016).

### 1.3.2. *Diagnóstico diferencial de la enfermedad de Parkinson*

En el diagnóstico diferencial de la EP se deben considerar todas aquellas entidades que puedan cursar con temblor y/o síndrome parkinsoniano, entre las que se incluyen los parkinsonismos secundarios, los asociados a enfermedades neurodegenerativas (parkinsonismos plus: parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, degeneración corticobasal; enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, enfermedad de Alzheimer con parkinsonismo, la enfermedad de Huntington variante de Westphal, enfermedad de Hallervorden-Spatz y atrofia espinocerebelosa) y otros como el temblor esencial (Sociedad Española de Neurología, 2019).

Los parkinsonismos secundarios son síndromes parkinsonianos producidos por una causa conocida y no por una enfermedad degenerativa. Suponen entre el 25-50% de estos e incluyen al parkinsonismo inducido por fármacos, al inducido por tóxicos, al vascular, al debido a lesiones ocupantes de espacio (tumores, hematomas), al de trastornos metabólicos (enfermedad de Wilson, enfermedades paratiroides) y al de enfermedades causadas por priones (fundamentalmente la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). De todos ellos, el inducido por fármacos es el más frecuente, destacando los neurolepticos (fenotiacinas, butirofenonas, neurolepticos atípicos como la risperidona, el aripiprazol o la olanzapina), bloqueadores de la entrada de calcio (flunaricina, cinaricina), antiepilépticos (fenitoína, valproato sódico), antiarrítmicos (amiodarona), hipotensores (metildopa, captopril) y otros (sales de litio, cimetidina). En cuanto al parkinsonismo inducido por tóxicos, cabe mencionar la exposición a pesticidas, muchas veces ocupacional, como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de parkinsonismo (Sociedad Española de Neurología, 2019). Otro a destacar sería el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), una neurotoxina formada a partir de la síntesis de meperidina, que ha demostrado producir daño en las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra y cuerpo estriado en roedores (M. Mustapha & Mat Talib, 2021).

## 1.4. Tratamiento farmacológico

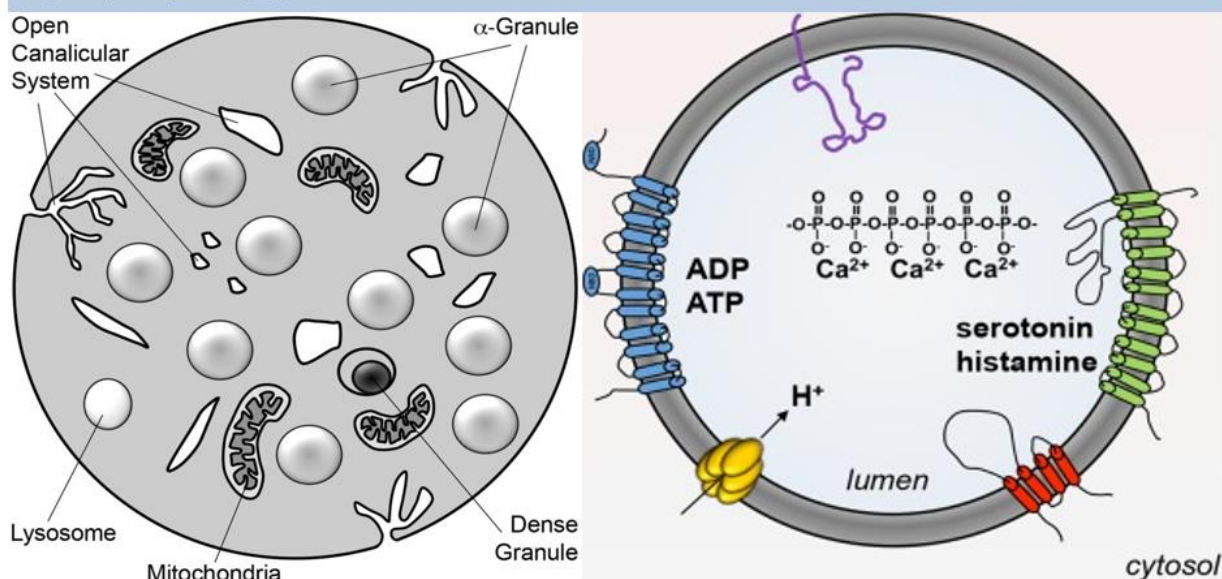
Dado que la pérdida de dopamina es la responsable de la mayoría de los síntomas motores de la EP, los tratamientos se basan en recuperar su función, ya sea cambiando a sus precursores, inhibiendo a las enzimas que la degradan o mediante agonistas (Zhen Qi et al., 2008). Estos incluyen a la L-DOPA, el fármaco antiparkinsoniano más eficaz disponible (Sociedad Española de Neurología, 2019) que ha de administrarse junto con un inhibidor periférico de la DDC (carbidopa o

benserazida); los agonistas dopaminérgicos, concretamente los derivados no ergóticos (pramiprexol, ropirinol, rotigotina), otro agonista sería la apomorfina, utilizada en la EP avanzada; los inhibidores MAO-B (monoamino oxidasa B): seleginina, rasagilina y safinamida; los inhibidores de la COMT (catecol-O-metiltransferasa): tolcapona y entacapona; y la amantadina (Sociedad Española de Neurología, 2019).

## 2. Plaquetas como modelo neuronal

Las plaquetas son células pequeñas (2-3  $\mu\text{m}$ ) y anucleadas derivadas de los megacariocitos de la médula ósea, cuya vida media es de unos 8-12 días. Tienen un papel fundamental en la hemostasia, iniciando la formación de trombos, además de constituir una fuente natural de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, platelet derived growth factor) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , transforming growth factor) (Blair & Flaumenhaft, 2009).

**Fig. 03| Plaquetas y gránulos densos**



La imagen de la izquierda representa las diferentes estructuras de una plaqueta: gránulos  $\alpha$ , gránulos densos, lisosomas, mitocondrias y sistema canalicular abierto (*Open Canalicular System*). La de la derecha, el contenido de un gránulo denso: el VMAT-2 (*verde*) se encarga de almacenar 5-HT en el interior del gránulo, una bomba de protones (*amarillo*) mantiene el pH del gránulo a aprox. 5,4 y el MRP4 (*azul*) se piensa que es capaz de almacenar nucleótidos de adenina (Modificado de Fitch-Tewfik, J. L., & Flaumenhaft, R., 2013).

Las plaquetas contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos:  $\alpha$ , densos o delta y lisosomas (**Fig. 03**). Estos gránulos primero se forman en los megacariocitos y luego maduran en las plaquetas circulantes. Los más abundantes son los gránulos  $\alpha$ , que poseen una gran variedad de proteínas de membrana y cargas solubles que se liberan en respuesta a diferentes estímulos mediante proteínas de la familia SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein*). Por contra, los gránulos densos son los menos abundantes (aproximadamente 3-8/plaqueta) y contienen altas concentraciones de cationes, polifosfatos, nucleótidos de adenina y aminos bioactivas como 5-HT (serotonina) e histamina, que también participan en la hemostasia y la trombosis. Cabe destacar que las plaquetas son el principal

reservorio de 5-HT en la sangre (Cataldo, L. R. et al., 2019; Montenegro P. et al., 2022). En la activación plaquetaria ambos tipos de gránulos liberan sus contenidos al intersticio mediante el proceso de exocitosis (Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013; Sharda & Flaumenhaft, 2018).

Los mecanismos de captación, acumulación y liberación de compuestos solubles en los gránulos de secreción de las plaquetas son similares a los observados en cultivos neuroendocrinos, por ejemplo, en las células cromafines o en las neuronas dopaminérgicas. Como se mencionó con anterioridad VMAT se encarga de transportar las catecolaminas desde el citosol hacia el interior de los gránulos de secreción. Este sistema de captación se ayuda de un gradiente protónico que se genera gracias a la acción de la ATPasa vesicular de protones, la V-ATPasa. Tanto el VMAT como la V-ATPasa no solo se encuentran en las VS de células cromafines o en las neuronas (VMAT<sub>1</sub> y VMAT<sub>2</sub>), sino que también se han encontrado en los gránulos densos de las plaquetas. De hecho, las plaquetas no sintetizan 5-HT por sí mismas, sino que la obtienen directamente de la sangre mediante transportadores de membrana SERT, para posteriormente introducirse en el interior de los gránulos. Mutaciones homocigotas de la VMAT<sub>2</sub> son causa de muerte neonatal precoz, mientras que las heterocigotas producen una respuesta de hipersensibilidad individual a las anfetaminas, la cocaína o el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). Otro sistema a destacar presente en los gránulos de ambos tipos celulares es el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT), responsable de la acumulación de ATP en la luz de las vesículas secretoras y que favorece la acumulación de aminos en su interior (Brunk et al., 2006; Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013).

Atendiendo a la teoría aminérgica del origen de Parkinson, una pérdida de 5-HT en plaquetas pondría de manifiesto un menor grado de compartimentalización de este neurotransmisor en gránulos, balance entre los sistemas vesiculares de captación y acumulación, y fenómenos de difusión no específica o *leak* (**Fig. 02**). Este hecho postulamos que sería reflejo de lo que estuviera sucediendo a nivel central en las neuronas dopaminérgicas, pudiendo preceder al daño neurológico previo a la aparición de los síntomas motores de la EP.



---

# OBJETIVOS

---



La neurodegeneración causada por la toxicidad de la dopamina (DA) y sus principales metabolitos, el DOPAC y especialmente el DOPAL, constituye una de las hipótesis que trata de explicar la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (EP), al encontrarse dichas sustancias libres en el citosol y no en el interior de las vesículas secretoras (VS) de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales.

En este aspecto, se ha observado que tanto las vesículas secretoras de estas neuronas como los gránulos densos de las plaquetas comparten mecanismos similares de acumulación de catecolaminas e indoles: DA y serotonina (5-HT), respectivamente. Estudiar la capacidad de captación, acumulación y liberación de 5-HT en plaquetas de sangre periférica podría correlacionarse con lo que sucede a nivel central en las neuronas dopaminérgicas y, dado el caso, postularse como una herramienta complementaria de diagnóstico preclínico y diferencial de la EP.

Trabajos previos (Figuroa A., 2018; Medina C.H., 2019; Montenegro P. et al., 2022) han estudiado estas cuestiones, vislumbrando una alteración en los citados mecanismos de gránulos densos plaquetarios de pacientes con EP en relación con las de sujetos sanos, hecho que podría utilizarse como posible marcador preclínico de esta enfermedad. Así, este presente trabajo intentará ir un paso más allá, teniendo como principales objetivos:

1. Reconvocar a voluntarios clínicamente sanos con análisis de plaquetas alterado que participaron entre 2019 y 2021 en el estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio, además de reclutar a otros nuevos y también a pacientes con EP.
2. Estudiar el comportamiento de la 5-HT en las plaquetas de estos sujetos mediante diferentes maniobras farmacológicas para evaluar la capacidad de captación, acumulación y liberación de este neurotransmisor.
3. Establecer la correlación entre el comportamiento de la 5-HT y la clínica de los sujetos convocados, entrando en detalle en aquellos voluntarios presumiblemente sanos que, sin embargo, mostraron un análisis de plaquetas con valores de EP.





---

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



# 1. Análisis general

A cada voluntario se le hizo un análisis general (o en su defecto, se examinó el último que tuviera hecho entre 2021-2022) con hemograma, bioquímica y hormonas (a través de la TSH fundamentalmente), con el fin de detectar posibles enfermedades que pudieran afectar al posterior análisis de plaquetas. Por ejemplo, se ha observado que la trombocitopenia produce una sobreestimación de la serotonina (5-HT), que el hipertiroidismo afecta al contenido proteico de las plaquetas y a su función o que las dislipemias podrían también sobreestimar la captación de 5-HT (Montenegro P. et al., 2022). A nivel clínico, sobre el estudio de la TSH, el hipotiroidismo (TSH alta) podría simular un síndrome parkinsoniano, por lo que debería ser considerado en el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Parkinson (Sociedad Española de Neurología, 2019).

## 2. Análisis de serotonina en plaquetas

### 2.1. Procedencia de las plaquetas, criterios de inclusión y exclusión

A lo largo del estudio desarrollado en nuestro laboratorio se usaron plaquetas humanas obtenidas a través de muestras de sangre de 75 pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) y 116 voluntarios sanos (familiares o acompañantes de estos fundamentalmente) que acudieron a las consultas de Neurología del Hospital Universitario de Canarias (San Cristóbal de La Laguna, Tenerife). De estos 116 voluntarios, se reconvocaron a 7 para repetir el estudio, así como a 10 nuevos sujetos de los cuales 6 corresponden a controles. Los resultados obtenidos se compararán con el total de controles sanos y pacientes con EP.

Antes de realizar la extracción, se rellenó una ficha clínica de cada uno de los participantes que incluía los siguientes apartados:

- Consentimiento informado de la participación en el estudio.
- Antecedentes personales.
- Antecedentes clínicos. Se preguntaba por enfermedades conocidas, medicación actual, antecedentes personales y familiares y sobre la presencia de algunos síntomas no motores.

Además, cada voluntario, sería identificado con los tres últimos números del DNI y la letra.

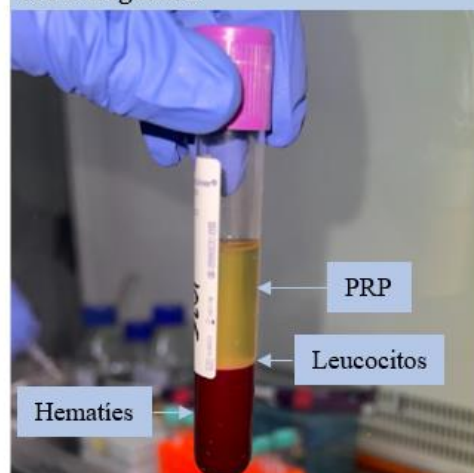
Por otro lado, se excluyeron a todos aquellos voluntarios que no pudieron acudir a las visitas programadas para el estudio por problemas de movilidad, fallecimiento o en caso de ser reconvocados por no querer seguir participando en el estudio.

### 2.2. Aislamiento y mantenimiento de plaquetas

El protocolo de aislamiento de plaquetas empleado es una modificación de otros protocolos ya estandarizados (Abcam®, Cambridge, UK), implementados por el Dr. Pablo Montenegro.

- 1) En primer lugar, se obtuvieron por venopunción dos tubos de 9 mL de sangre (BD-Vacutainer® con 18 mg de K<sub>2</sub>-EDTA: Plymouth, UK) de cada participante. Cada uno de ellos se movió dos veces por inversión y se dejó reposar en posición horizontal alrededor de 10-15 min a temperatura ambiente.
- 2) Seguidamente, se centrifugaron a 200xg durante 20 min. Tras este paso quedaron tres columnas (desde la parte más alta a la más baja): plasma rico en plaquetas (PRP), leucocitos y hematíes (**Fig. 04**).
- 3) Luego se recogieron 2/3 de la primera fracción del sobrenadante correspondiente al PRP con una pipeta Pasteur de plástico (4 mL/tubo aprox.), para evitar recoger leucocitos y hematíes y se pasó a un tubo estéril de polipropileno de 15 mL (JetBiofil®, Guangdong, China).
- 4) Se mezcló el sobrenadante en relación 1:1 con una solución tamponadora, el HEP Buffer (NaCl 140 mM, KCl 2,7mM, EGTA 5 mM, HEPES 3,8 mM, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 µg/mL, pH 7,4 NaOH) suplementado con prostaglandina E1, para evitar la activación plaquetaria, quedando una concentración final de 1 µM.
- 5) Se volvió a centrifugar, esta vez a 100xg durante 15 min, tras lo cual se volvió a recoger el sobrenadante en un nuevo tubo estéril de 15 mL y se centrifugó a 800xg durante 20 min.
- 6) Se descartó el sobrenadante, quedando un pellet de plaquetas. Este se lavó dos veces en 1 mL de un buffer de citrato (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, D-glucosa 50 mM, citrato-Na<sup>+</sup> 10 mM, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 µg/mL pH 7,4 NaOH), evitando en todo momento la resuspensión del pellet.
- 7) Finalmente, se resuspendió el pellet en la solución SSP++ (NaCl 69,3 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 28,2 mM, citrato-Na<sup>+</sup> 10,8 mM, Acetato-Na<sup>+</sup> 32,5 mM, D-glucosa 5 mM, Ascórbico 10 µM, prostaglandina E1 1 µM, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 µg/mL, pH 7,4 NaOH) al mismo volumen que el PRP. Mediante este proceso debería quedar un promedio de 100.000 plaquetas/µL de solución.

**Fig. 04| Columnas tras la primera centrifugación**



Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente y sin frenado.

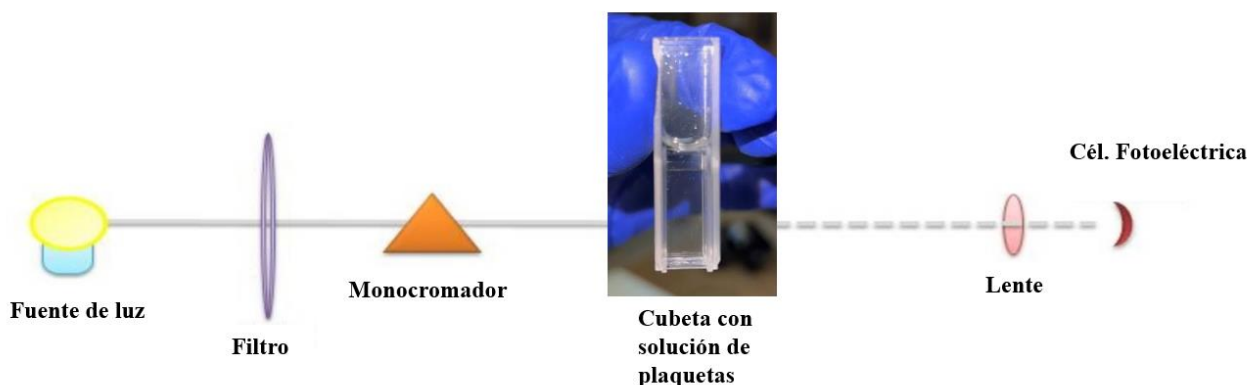
Las plaquetas, durante el periodo experimental, se mantuvieron en un tubo biorreactor (TubeSpin, TPP®, Trasadingen, Suiza) a temperatura ambiente en un incubador humidificado y en rotación continua a 30° (Movil-Rod, J.P Selecta, Abrera, Barcelona, España). Con este protocolo las plaquetas han resultado viables durante un periodo de 7 días.

### 2.3. Normalización del número de plaquetas

Para normalizar el número de plaquetas presentes en cada muestra se utilizó el análisis por turbidimetría. Esta técnica consiste en medir la pérdida de intensidad de la luz transmitida debido al efecto de dispersión de las partículas suspendidas en ella. La luz pasa a través de un filtro creando

una luz de longitud de onda conocida que luego pasa por una cubeta que contiene la solución de plaquetas (**Fig. 05**). Luego, una célula fotoeléctrica recogería la luz que pasaría a través de la cubeta y determinaría entonces la cantidad de luz absorbida, que sería directamente proporcional al número de plaquetas en dicha solución (Vasudevan, 2010).

**Fig. 05| Componentes y esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro (modificado de Medina C.H, 2019)**



Todas las medidas de concentración fueron realizadas en un espectrofotómetro GENESYS™ 20 (ThermoSpectronic). Se usaron 600 nm de longitud de onda para determinar la concentración de plaquetas. 100  $\mu\text{L}$  de plaquetas aisladas se diluyeron en 900  $\mu\text{L}$  de SSP++ (relación 1:9) y como solución blanco se usó una solución de SSP++. Tras realizar las medidas, el volumen diluido se corrigió a una concentración de 100.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ .

## 2.4. Experimentos de captación y liberación

Tanto los experimentos de captación, total y específica, como los de liberación se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo cónico y superficie hidrofóbica (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

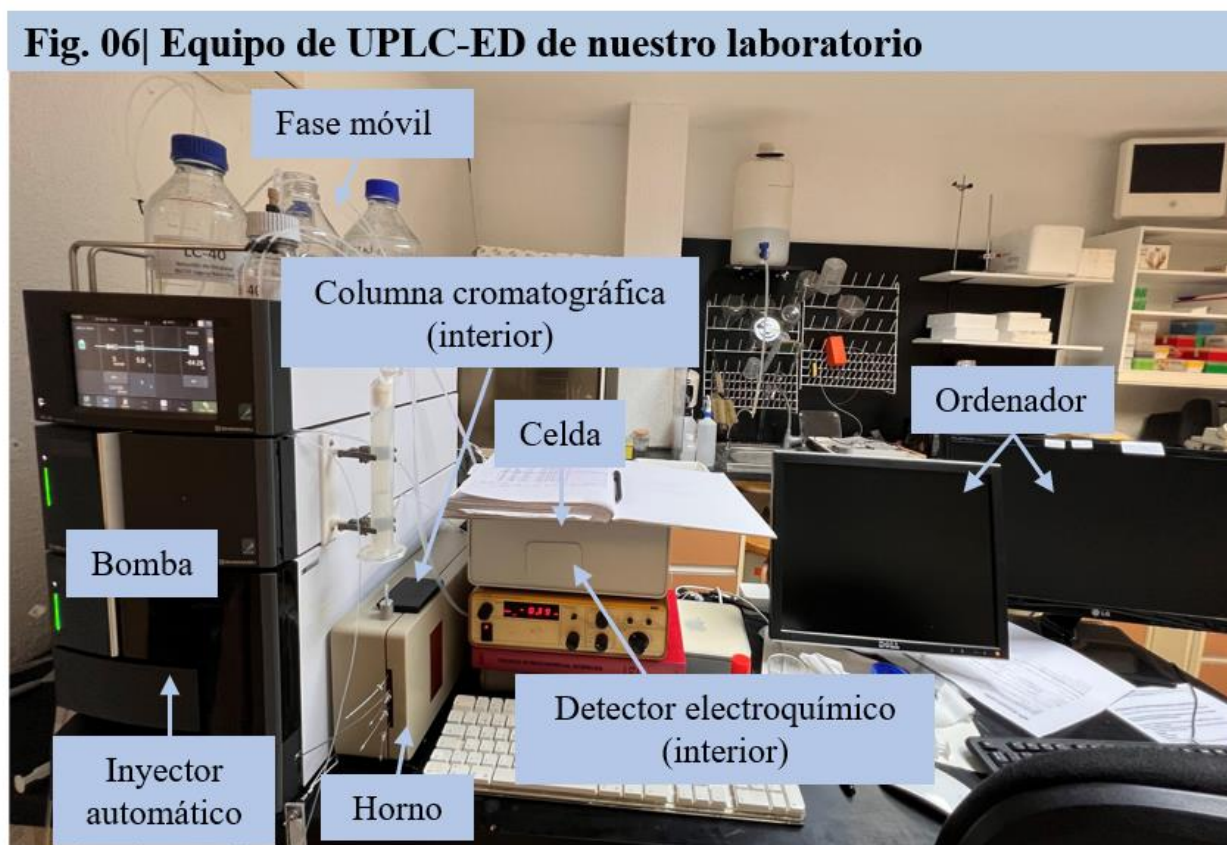
Para los experimentos de captación específica y total se dispusieron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de una solución SSP+ (similar a la SSP++ pero sin prostaglandina E1, ni ascórbico), en presencia o ausencia de reserpina 2,25  $\mu\text{M}$  respectivamente. Luego, las plaquetas se sembraron a una densidad de  $10^7$ /pocillo (100  $\mu\text{L}$ ) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, a oscuras y en agitación continua. Tras este periodo de incubación, se añadieron 25  $\mu\text{L}$ /pocillo de una solución SSP+ suplementada con ascórbico 225  $\mu\text{M}$  y 5-HT en diferentes concentraciones (desde 0 hasta 33  $\mu\text{M}$ , concentración final), incubándose otras 2 h adicionales. Tras este tiempo, las placas fueron enfriadas a 4°C y centrifugadas a 3.200xg durante 10 min, empezando en este momento la cadena de frío. Luego se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de plaquetas con 200  $\mu\text{L}$  de SSP+, tras lo cual se volvieron a centrifugar a 3.200xg durante 5 min. Luego, el pellet se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y se añadieron 175  $\mu\text{L}$  de una solución de HPLC-A (PCA 0,05625N, L-cisteína 337,5  $\mu\text{M}$ , EDTA 337,5  $\mu\text{M}$ , isoproterenol 225 nM como estándar interno, IS). Finalmente, las placas se congelaron a -80°C, mínimo, durante toda la noche.

Por otro lado, para los experimentos de liberación, las plaquetas se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^7$ /pocillo (200  $\mu\text{L}$ ) y se centrifugaron a 800xg sin freno y a temperatura ambiente durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las muestras cuidadosamente en 100  $\mu\text{L}$  de una

solución SSP+ suplementada con ascórbico 2  $\mu\text{M}$  y en presencia o ausencia de trombina (4 U/mL, concentración final), con el fin de evaluar la liberación activa o difusión pasiva de la 5-HT respectivamente. Seguidamente las placas se incubaron durante 90s a oscuras y a temperatura ambiente. Se procedió al enfriamiento a 4°C y centrifugación a 3200xg durante 10 minutos, comenzando a partir de este momento la cadena de frío. A continuación, se preparó una placa con 5 $\mu\text{L}$ /pocillo con la solución HPLC-B (PCA 0,85 N, L-cisteína 5,1 mM, EDTA 5,1 mM, IS 3,4  $\mu\text{M}$ ). Se tomaron cuidadosamente 80  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra centrifugada y se añadieron a la solución anterior, congelándose a -80°C durante toda la noche. Por otra parte, el pellet de la muestra se centrifugó 5min a 3200xg, siguiendo a partir de ahí el mismo protocolo de lavado y dilución de las muestras de captación.

## 2.5. Determinación de la concentración de serotonina y proteínas

El día de la determinación de la concentración de 5-HT, las placas se descongelaron a 4°C y luego se centrifugaron a 3200xg durante 10 min, manteniendo la misma cadena de frío descrita con anterioridad. Posteriormente, 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra (80  $\mu\text{L}$  del experimento de liberación) se dispuso para el análisis de 5-HT y el pellet de proteínas para la cuantificación proteica. El análisis de serotonina (5-HT) se determinó mediante UPLC-ED (cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detección electroquímica) y fue realizado por el Dr. Ricardo Borges. En la **Fig. 06**, se muestran las diferentes partes del equipo de UPLC-ED utilizado para dichos análisis.



En cuanto a las condiciones del UPLC-ED, el detector electroquímico se fijó a 700 mV con respecto al electrodo de referencia y se usó una columna reversa de C18 puesta en un horno a 46°C. Además, la fase móvil fue un tampón fosfato a un pH de 3,5 (ácido ortofosfórico): H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> 9,66 g/L, EDTA 3,2 mg/L, metanol (8-12% v/v). Esta solución se filtró a través de un poro de 0,22 µm (Millipore) y luego se desgasificó por burbujeo con helio. Las muestras (15-25 µ/L) fueron inyectadas mediante un autoinyector (SIL-40CX3, Shimadzu) enfriado a 5°C, mientras que los cromatogramas fueron registrados en un ordenador a una frecuencia de adquisición de 1Hz y usando un programa de LabView 11 desarrollado por el Dr. Yézer González. El estándar externo fueron 200 nM de 5-HT.

Asimismo, con el objetivo de normalizar las muestras comparadas en los experimentos de captación y liberación, se hizo una cuantificación de plaquetas mediante la cantidad total de proteínas plaquetarias. Para ello se utilizó la técnica del ácido bicinconínico (BCA), un método de determinación de la concentración de proteínas modificado del método de Lowry, que se basa en una reacción colorimétrica con complejos de cobre-BCA. En primer lugar, se resuspendió el pellet de proteínas en 35 µL/pocillo de una solución de lisis (SDS 5% m/v, NaOH 0,1M). Luego se llevaron 25 µL/pocillo de muestra a la placa de análisis de proteínas, junto a 25 µL/pocillo de una solución de albúmina de suero bovino como línea de calibrado (0-2 mg/mL en solución de lisis). Tras esto, se mezclaron el BCA con la solución de cobre (CuSO<sub>4</sub> 4% m/v), añadiendo 200 uL/pocillo en cada muestra y se incubaron a 37°C en oscuridad durante unos 30 min. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas mediante un lector de placas (iMark microplate reader, Biotek instruments Inc, Winooski, USA) a unos 540-590 nm de longitud de onda.

## 2.6. Análisis y estadística de los resultados

Para el análisis de los datos obtenidos por UPLC-ED se utilizó el programa IGOR-Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) a través de una macro realizada por el Dr. Miguel A. Brioso. En la **Fig.07** se observan los cromatogramas obtenidos.

Para pasar de carga (nC, nano Coulombios) a concentración se usó la siguiente fórmula:

$$[5 - HT](nM) = \frac{\text{Área de } 5 - HT (nC) \times [\text{Isoprotenerol}](nM) \times FC}{\text{Área de isoprotenerol} (nC)}$$

Donde FC es el factor de corrección, obtenido a partir de los estándares externos. La concentración de 5-HT de las muestras posteriormente se normalizaría según la concentración de proteínas.

Todos los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Prism 5 (GraphPad) (California, USA). Los datos se representaron como medias ± error estándar y los análisis estadísticos de varianza (ANOVA), T-Student u otros test no paramétricos se fijaron a un nivel de significación de p<0,05, p<0,01, p<0,005.

**Fig. 07| Cromatogramas obtenidos de UPLC-ED**

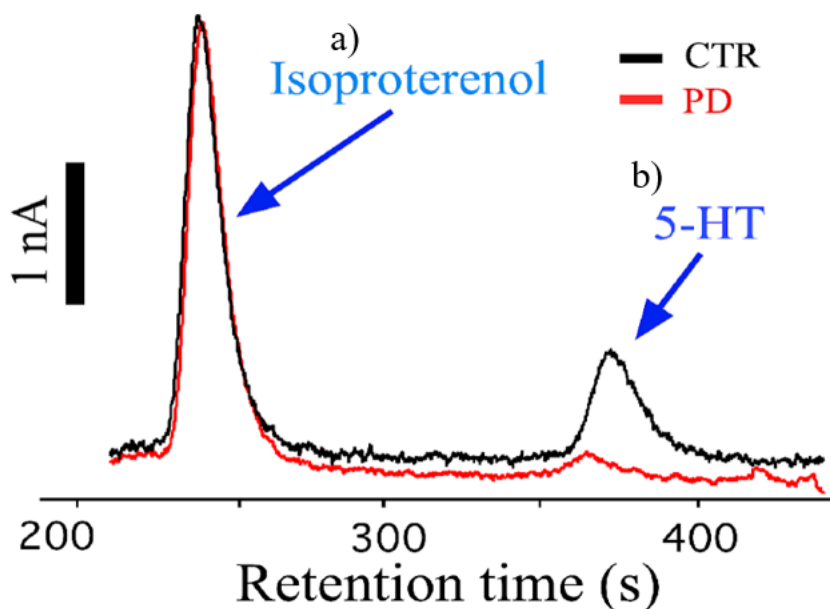


Imagen de cromatogramas superpuestos (voltaje: nanoamperios (nA) versus tiempo, *Retention time*: segundos (s) en los que se pueden observar los dos frentes: a) isoprotenerol (estándar interno) y b) 5-HT. Nótese la diferencia entre el pico de 5-HT en CTR (controles) y PD (*Parkinson Disease*, Enfermedad de Párkinson).

## 2.7. Materiales y reactivos

- La 5-HT fue suministrada por Sigma-Aldrich.
- Las sales y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) o Merck (Darmstadt, Alemania).
- Todo el material necesario para la realización de la electroforesis fue suministrado por BioRad (California, USA).
- El agua fue purificada en un sistema Elix10/MilliQ Gradient A-10 de Millipore (Darmstadt, Alemania).
- El resto de material se ha especificado con anterioridad durante la descripción de los protocolos.



---

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



# 1. Establecimiento de criterios de selección de voluntarios

Con anterioridad al presente trabajo (Montenegro P. et al., 2022), se determinaron unos umbrales (**Tabla 2**) para definir los valores “normales” y “patológicos” en cuanto a contenido de serotonina (5-HT) en plaquetas, tanto basal (Basal) como de captación total (Utpk) y específica (Utpk spc). Dichos umbrales se definieron arbitrariamente como la diferencia entre la media y la desviación estándar de los valores control ( $Mean - SD$ ). De esta manera, aquellos valores inferiores a 1,76 nmol/mg proteína en Basal, y a 7,91 nmol/mg proteína en Utpk serían considerados patológicos.

<b>Tabla 2  Umbrales basales y de captación total y específica de serotonina 2019-2021</b>			
	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Umbral</b>
Ctrl basal	3,10	1,34	<b>1,76</b>
PD basal	1,47	1,23	2,70
Ctrl Utpk	11,62	3,71	<b>7,91</b>
PD Utpk	7,34	2,56	9,91
Ctrl Utpk spc	8,79	2,11	<b>6,68</b>
PD Utpk spc	4,15	1,68	5,83

Se muestran la media (Mean) y su correspondiente desviación estándar (SD), expresados en nmol/mg proteína, para voluntarios clínicamente sanos (Ctrl) y pacientes con enfermedad de Parkinson (PD). Basal: contenido nativo de serotonina (5-HT); Utpk: captación total de 5-HT; Utpk spc: captación específica de 5-HT.

Estos criterios umbral también sirvieron para decidir con cuánta prioridad debíamos reconvocar o no a aquellos voluntarios que ya habían participado en el estudio en el periodo comprendido entre 2019-2021 (Montenegro P. et al., 2022). Tendrían una prioridad alta aquellos controles con niveles de 5-HT “patológicos” al menos en dos de las condiciones estudiadas y una prioridad intermedia aquellos con una de las condiciones afectada.

De igual forma, aquellos pacientes con EP y valores “normales” en alguna de las condiciones establecidas serían objeto de un estudio más exhaustivo, destacando aquellos con valores por encima de la suma de la media y desviación estándar de los valores de EP ( $Mean + SD$ ). Aunque dicho estudio rebasa el contenido del presente trabajo, estos nuevos umbrales permitieron establecer un tercer criterio de prioridad, bajo, para reconvocar voluntarios clínicamente sanos con valores intermedios entre los umbrales control y EP.

Dentro del grupo de prioridad alta, destacaron 5 sujetos presumiblemente sanos (189K, 267P, 277R, 876D) que obtuvieron un contenido basal de 5-HT en gránulos plaquetarios bajo y una captación total de 5-HT llamativamente baja, como se observa en la **Fig. 08** (flechas azules).

**Fig. 08| Controles con valores patológicos**

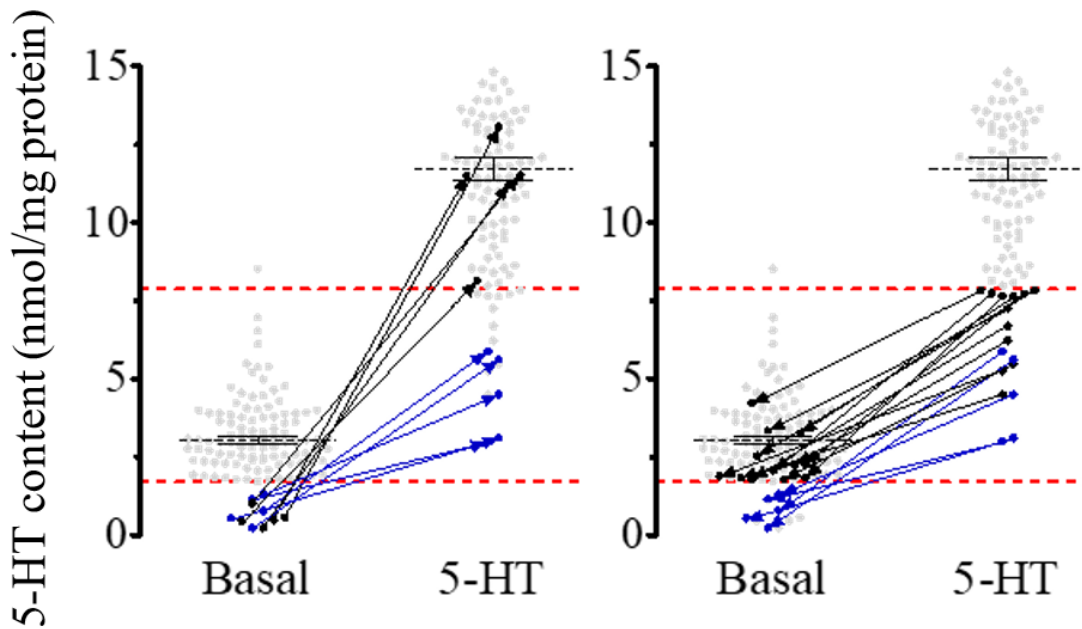


Imagen en la que se representa en el eje de ordenadas el contenido de serotonina (5-HT) en nmol/mg proteína y en el de abscisas el contenido basal de 5-HT (*Basal*) y la captación total de 5-HT tras incubar las plaquetas durante 2h a 10  $\mu$ M de 5-HT (*Utpk 5-HT*) en controles, es decir, en voluntarios sanos. Las líneas discontinuas rojas señalan los umbrales a partir de los cuales, valores inferiores serían compatibles con pacientes con enfermedad de Parkinson: en *Basal* 1,76 y en cuanto a *Utpk 5-HT* 7,91 nmol/mg proteína. Las flechas azules representan a los sujetos presumiblemente sanos con valores patológicos, que presentan una *Basal* de 5-HT y una *Utpk 5-HT* bajas.

Se les realizó un estudio clínico más exhaustivo a 3 de los 5 sujetos iniciales (189K, 267P, 277R), considerándolos como pacientes con EP. Este estudio incluyó: historia clínica, cuestionario sobre la presencia de síntomas no motores de la EP, exploración física tomando como referencia la parte motora (sección III) de la escala MDS-UPDRS (*Movement Disorders Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), analítica general y pruebas de imagen como resonancia magnética nuclear (RMN) y DaT-SCAN (**Tabla 3**).

**Tabla 3| Resumen de los hallazgos de la parte clínica y análisis general (2021-2022)**

ID	Análisis general	Antecedentes personales	Antecedentes familiares neurológicos	Hábitos tóxicos y exposición a tóxicos	Medicación actual	Cuestionario de SNM (31 preguntas)	Escala UPDRS parte motora (total de 68 puntos)	Atipias	DaT-SCAN	RMN cerebral
189K	Hipertotasemia	HPB, VPPB	NO	Enolismo, insecticidas	1 fármaco	5	1	Reflejo glabellar inagotable	Hipocaptación en putamen derecho	Hiposeñal en ambos putámenes
267P	N	DMII, HTA, artrosis	NO	Tabaquismo	>5 fármacos	6	1	NO	-	N
277R	Anemia normocítica leve, trombocitosis, hiperuricemia, hiposideremia, hipertrigliceridemia	Cáncer de mama, anemia, VPPB, ictus de la ACM en julio 2021	Hija con EP diagnosticada a los 37 años	Tabaquismo, posible exposición a tóxicos	>5 fármacos	8	9	ROT asimétricos, discinesias orolinguales leves	N	N
876D, 780K	No fue posible el estudio									

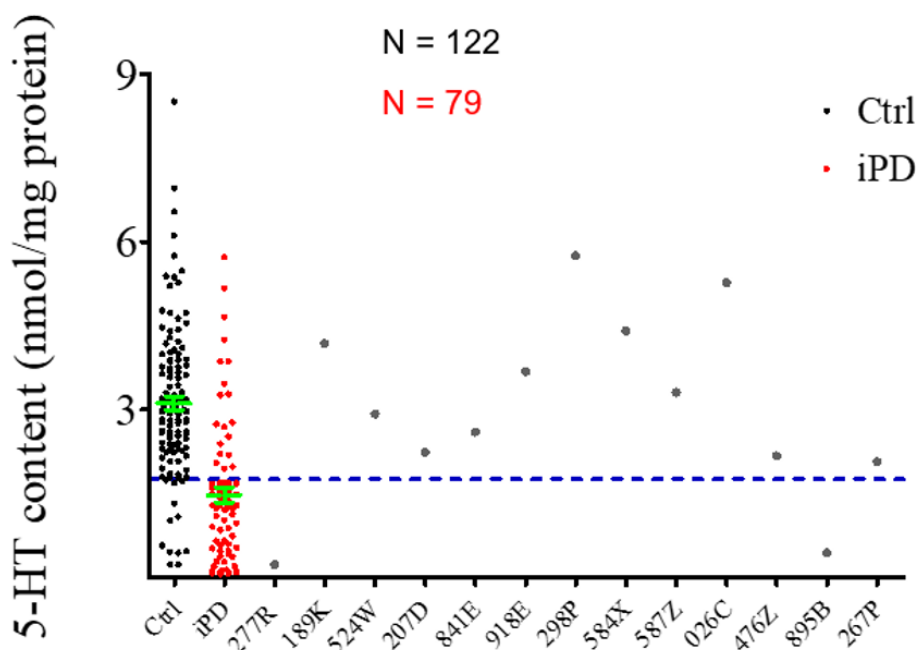
ID: identificación. HPB: hipertrofia prostática benigna. VPPB: vértigo posicional paroxístico benigno. DMII: diabetes mellitus tipo 2. HTA: hipertensión arterial. ACM: arteria cerebral media. EP: enfermedad de Parkinson. ROT: reflejos osteotendinosos. N: normal. -: no realizado.

## 2. Análisis del contenido basal de serotonina en plaquetas

Como se ha descrito en el apartado Material y Métodos, se reconvocaron un conjunto de voluntarios clínicamente sanos con alguna alteración en los niveles de 5-HT que habían participado en el estudio durante 2019-2021 (026C, 189K, 267P, 277R, 476Z, 524W y 841E). Aparte, durante el presente trabajo participaron nuevos voluntarios control (207D, 298P, 584X, 587Z, 895B, 918E) para el estudio. En todos los casos se analizó el contenido nativo o basal de 5-HT comparándolos con los anteriores resultados obtenidos.

En la **Fig. 09**, se representan dicho conjunto de sujetos junto al total de voluntarios clínicamente sanos (Ctrl, puntos negros, N=122) y de pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática (iPD, puntos rojos, N=79).

**Fig. 09** | Contenido basal de serotonina



Contenido basal de 5-HT en nmol/mg proteína en *Ctrl* (controles, voluntarios sanos), *iPD* (pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática) y el resto representa a los 13 sujetos tanto nuevos como reconvocados a estudio. La línea discontinua azul representa el umbral basal en Ctrl (1,76 nmol/mg proteína).

Se puede observar cómo la mayor parte de los Ctrl se sitúan en niveles normales de 5-HT por encima de 1,76 nmol/mg proteína y los iPD por debajo de dicho límite. De los 13 sujetos sanos, cabe destacar al 277R y al 895B, con niveles de contenido basal de 5-HT ciertamente bajos (0,23 y 0,44 nmol/mg proteína respectivamente).

En el caso del sujeto 895B dicho nivel podría tener relación con un antecedente de depresión endógena, una patología en la que los niveles de 5-HT basales se han descrito como habitualmente bajos (Tuomisto J. & Tukiainen E., 1976).

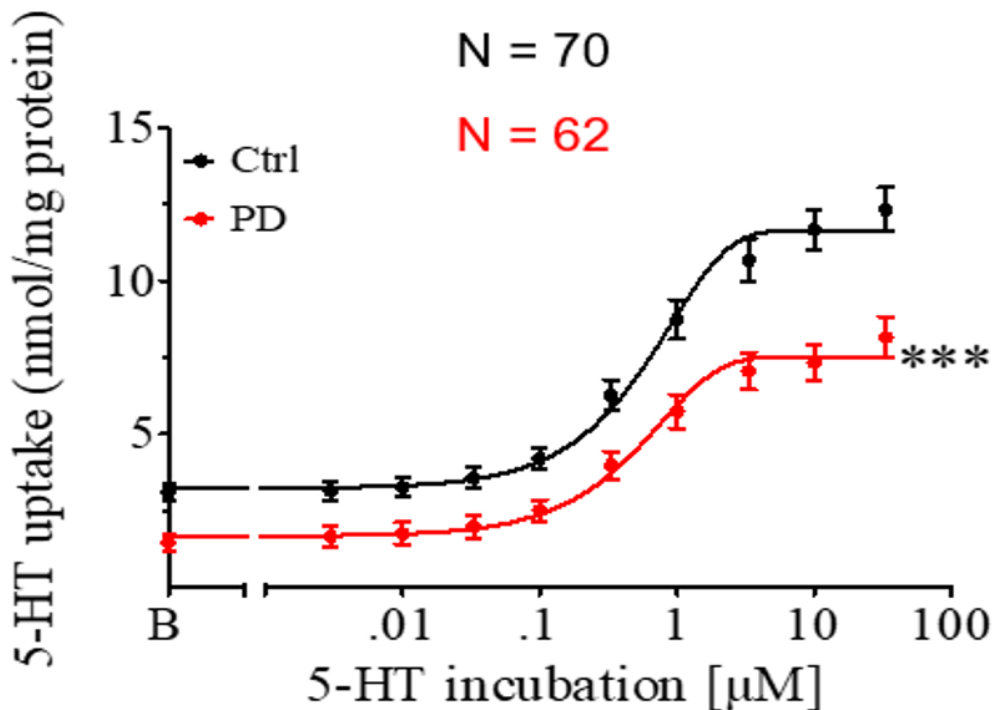
### 3. Análisis de la captación total de serotonina en plaquetas

Con el fin de esclarecer no solo los niveles nativos de 5-HT en plaquetas sino su capacidad de captación y acumulación se procedió a realizar experimentos dosis dependientes de incubación con este neurotransmisor. Los resultados obtenidos se incorporaron a los previos del estudio comprendido entre 2019-2021.

En la **Fig.10**, se puede observar que la captación total de 5-HT tras incubar las plaquetas durante 2h a concentraciones crecientes de este indol en voluntarios sanos (Ctrl) es claramente superior a la de pacientes con enfermedad de Parkinson (PD) junto a lo ya mencionado que dichos Ctrl parten de un contenido basal de 5-HT en gránulos plaquetarios (B) también mayor ( $3,11 \pm 0,12$  nmol/mg proteína en Ctrl frente a  $1,47 \pm 0,14$  nmol/mg proteína en PD; media  $\pm$  SEM).

Nótese que tras añadir  $10 \mu\text{M}$  de 5-HT en el medio de incubación, ambas curvas permanecen estables, de manera que aumentos de 5-HT en dicho medio no suponen aumentos en la captación total de 5-HT.

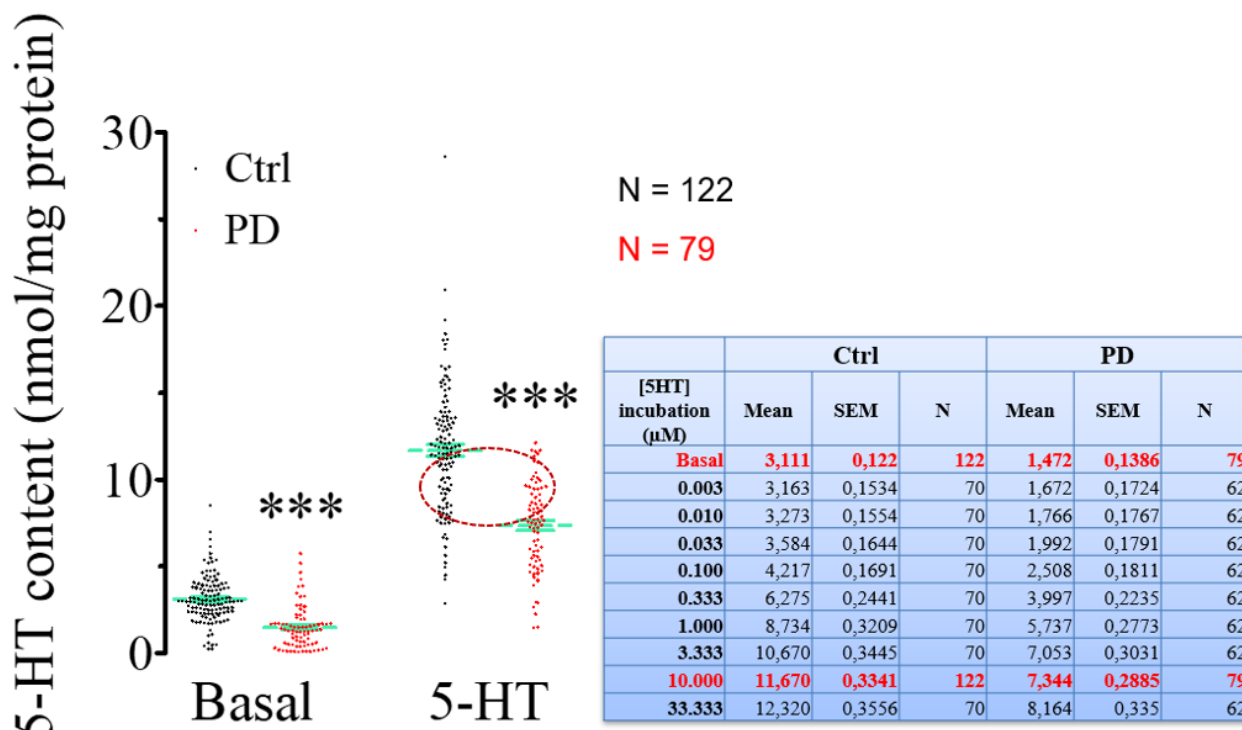
**Fig. 10| Curvas de captación total de serotonina**



Captación total de serotonina (5-HT) tras incubar las plaquetas durante 2h a concentraciones crecientes de 5-HT en nmol/mg proteína en 70 *Ctrl* (controles, voluntarios sanos) y 62 *PD* (pacientes con enfermedad de Parkinson). Nótese que tras añadir  $10 \mu\text{M}$  de 5-HT en el medio de incubación, ambas curvas permanecen estables. (ANOVA \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$ )

En la **Fig.11**, se han representado los datos anteriores mediante una gráfica de puntos (*dotplots*) con solo los valores de contenido nativo de 5-HT y tras la incubación con 10  $\mu\text{M}$  de este neurotransmisor. La captación total es, de nuevo, significativamente mayor en Ctrl que en PD ( $11,67 \pm 0,63$  nmol/mg proteína frente a  $7,34 \pm 0,29$  nmol/mg proteína, respectivamente).

**Fig. 11| Captación total de serotonina *dotplots***



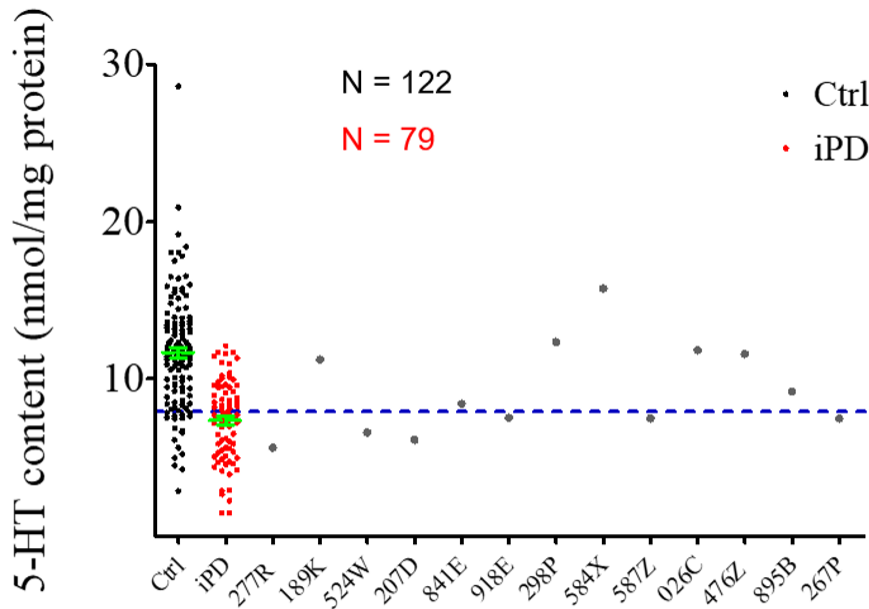
A la izquierda del gráfico, el contenido basal de serotonina (5-HT) (*Basal*) y a la izquierda la captación total de 5-HT (*Utpk 5-HT*) tras incubar las plaquetas durante 2h a concentraciones crecientes de 5-HT en nmol/mg proteína en 122 *Ctrl* (controles, voluntarios sanos) y 79 *PD* (pacientes con enfermedad de Parkinson). También se añade una tabla a partir de cuyos datos se ha obtenido el gráfico de la *Utpk 5-HT*: *Mean* (media); *SEM* (error estándar de la media). El círculo rojo de puntos discontinuos representa valores de “solapamiento” entre *Ctrl* y *PD*. (Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$ )

Similar a la representación de contenido nativo de 5-HT vista en la **Fig. 09**, en la siguiente gráfica (**Fig. 12**) se puede observar los niveles individuales de captación de 5-HT en cada uno de los sujetos de estudio.

De estos, el sujeto 277R presentó correlación con el valor basal de 5-HT (5,62 nmol/mg proteína), mientras que 524W, 207D, 587Z, 918E y 267P presentan solo una captación total baja (6,59, 6,13, 7,49, 7,53 y 7,49 nmol/mg proteína respectivamente).

El sujeto 895B, con un contenido de 5-HT nativo bajo, presentó una captación normal, lo que apoya más la hipótesis de un cuadro clínico depresivo sin alteración funcional de plaquetas.

**Fig. 12| Captación total de serotonina**



Captación total de serotonina (5-HT) tras incubar las plaquetas durante 2h a 10  $\mu$ M de 5-HT en nmol/mg proteína en *Ctrl* (controles, voluntarios sanos), *iPD* (pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática) y el resto representa a los 13 sujetos tanto nuevos como reconvocados a estudio. La línea discontinua azul representa el umbral de captación total en *Ctrl* (7,91 nmol/mg proteína).

## 4. Análisis de captación de serotonina en gránulos densos plaquetarios

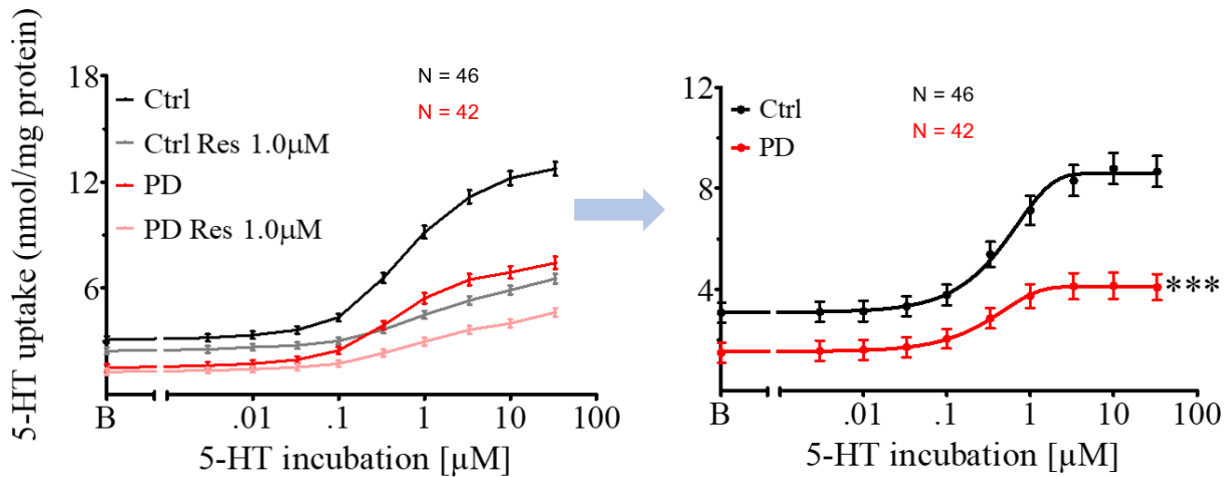
Si bien el estudio del contenido basal de 5-HT de las plaquetas y su capacidad de captación ha mostrado que existen diferencias significativas entre los pacientes de EP con respecto a los sujetos control, también cabe señalar que, a nivel individual, existe cierto grado de “solapamiento” entre valores (**Fig. 11**, círculo rojo de líneas discontinuas). Como posible herramienta diagnóstica se evaluó la capacidad de captación de los gránulos plaquetarios de manera íntegra, teniendo que eliminar para ello un componente inespecífico de acumulación de 5-HT (Montenegro et al., 2022).

Dicho componente se pudo estimar de manera indirecta a través de la incubación dosis creciente con 5-HT en presencia de un inhibidor irreversible del VMAT, la reserpina. La captación intrínseca de los gránulos (Utpk spc) se calculó restando a la captación total de 5-HT (Utpk) la componente en presencia de reserpina y posteriormente sumarle el contenido nativo de 5-HT.

En la **Fig. 13**, se observan las curvas de captación específica tanto para el total de voluntarios sanos (*Ctrl*) como para el de pacientes con enfermedad de Parkinson (*PD*). Se puede observar que los valores de Utpk spc en voluntarios clínicamente sanos (*Ctrl*) no solo son superiores con respecto a pacientes con enfermedad de Parkinson (*PD*), sino que las diferencias son superiores frente a lo visto con anterioridad en captación total (**Fig. 10**). Representando los datos anteriores en un gráfica de puntos (**Fig. 14**), se observa un menor solapamiento entre *Ctrl* y *PD* que había sido detectado previamente en la Utpk total, obteniendo una Utpk spc media en *Ctrl* de  $8,79 \pm 0,31$  nmol/mg proteína frente a  $4,15 \pm 0,26$  nmol/mg proteína en *PD*.

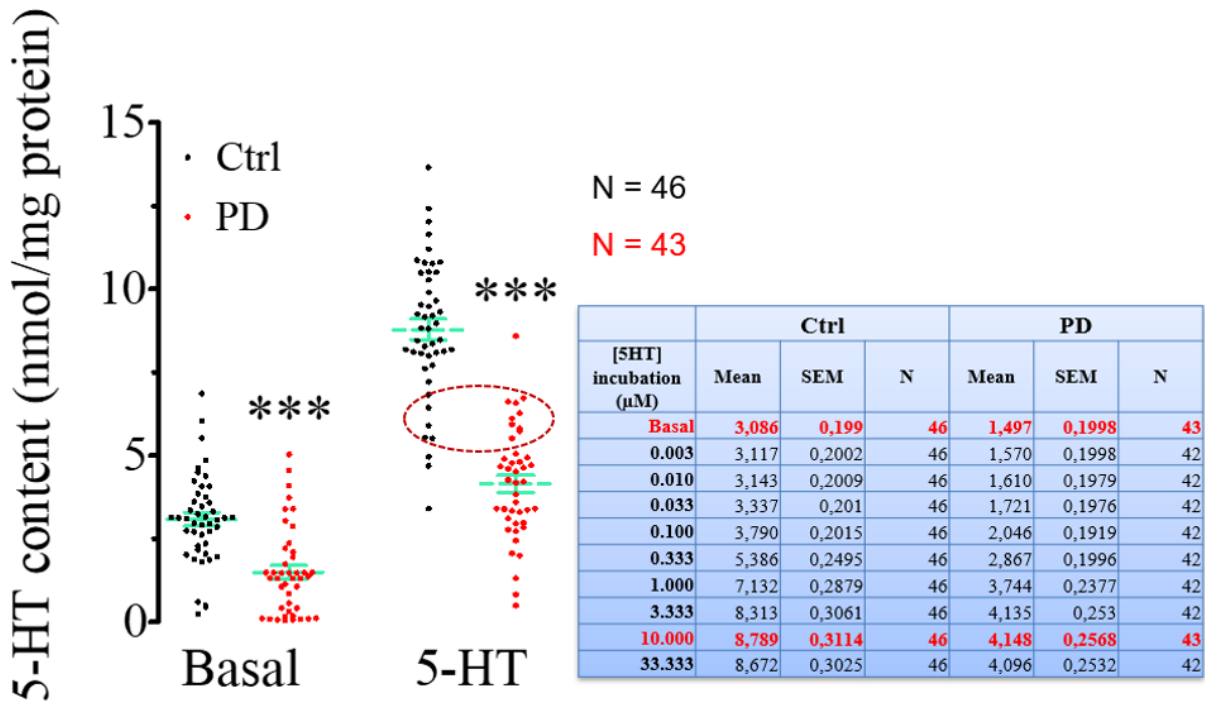


**Fig. 13| Curvas de captación específica de serotonina**



A la izquierda, captación específica de 5-HT (*Utpk spc*) tras incubar las plaquetas durante 2h a concentraciones crecientes de 5-HT en nmol/mg proteína en 46 *Ctrl* (controles, voluntarios sanos) y 42 *PD* (pacientes con enfermedad de Parkinson). Dicha *Utpk spc* se ha obtenido a partir de restar a la captación total de 5-HT (*Utpk*) la captación en presencia de reserpina a 1 µM (Res 1.0 µM) y posteriormente sumarle el contenido basal (B), obteniéndose las curvas de *Utpk spc* que se muestran en la parte derecha de la figura. (ANOVA, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$ )

**Fig. 14| Captación específica de serotonina dotplots**



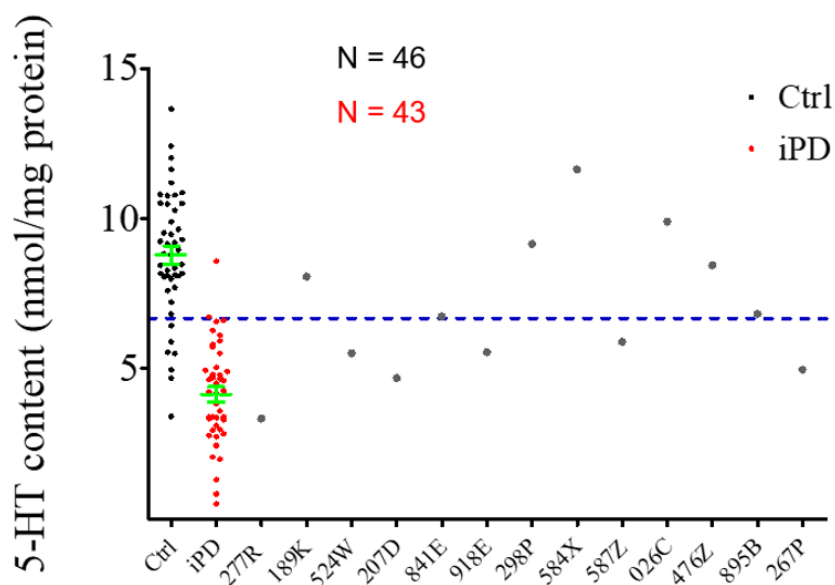
A la izquierda del gráfico, el contenido basal de serotonina (5-HT) (*Basal*) y a la izquierda la captación específica de 5-HT (*Utpk spc*) tras incubar las plaquetas durante 2h a concentraciones crecientes de 5-HT en nmol/mg proteína en 46 *Ctrl* (controles, voluntarios sanos) y 43 *PD* (pacientes con enfermedad de Parkinson). También se añade una tabla a partir de cuyos datos se ha obtenido el gráfico de la *Utpk spc*: *Mean* (media); *SEM* (error estándar de la media). El círculo rojo de puntos discontinuos representa valores de “solapamiento” entre *Ctrl* y *PD*. (Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$ )

Finalmente, similar a las gráficas individuales anteriores, en la **Fig. 15** se observa que 7 controles se sitúan en valores normales de Utpk spc por encima de 6,68 nmol/mg proteína, umbral establecido para este análisis (**Tabla 02**).

Atendiendo a los criterios umbrales para captación específica, no se observa solapamiento entre los valores numéricos de Ctrl y iPD, de modo que aquellos sujetos comprendidos entre ese rango (6,68 y 5,83 nmol/mg proteína) serían puestos a consideración para futuros análisis pero no estrictamente “patológicos”. En ese criterio se encuentra el sujeto 587Z (5,90 nmol/mg proteína).

De esta forma, aquellos voluntarios con valores inferiores a 5,83 nmol/mg proteína serían propiamente “patológicos”, encontrándose con dichos valores los sujetos 277R, 267P, 207D, 524W y 918E (3,34, 4,97, 4,69, 5,52 y 5,55 nmol/mg proteína respectivamente).

**Fig. 15** Captación específica de serotonina



Captación específica de 5-HT tras incubar las plaquetas durante 2h a 10  $\mu$ M de 5-HT en nmol/mg proteína en *Ctrl* (controles, voluntarios sanos), *iPD* (pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática) y el resto representa a los 13 sujetos tanto nuevos como reconvocados a estudio. La línea discontinua azul representa el umbral de captación específica en Ctrl (6,68 nmol/mg proteína).

El sujeto 277R, debe recordarse que ya en experimentos anteriores mostraba resultados anormalmente bajos para ser un Ctrl (contenido basal y captación total de 5-HT previas bajas) y no sólo eso, sino que a este sujeto ya se le había reconvocado en otras ocasiones y realizado los experimentos obteniendo resultados similares. Además, destacaba entre sus antecedentes una hija diagnosticada de PD a los 37 años, una edad particularmente precoz para el diagnóstico de esta enfermedad.

Por otro lado, a este sujeto se le realizó un estudio clínico más exhaustivo durante la realización de este trabajo, siendo importante recalcar que presentó una mayor puntuación en el UPDRS, aunque dicha exploración fue realizada unos meses después de un ictus que sufrió en julio de 2021 el

voluntario y que, por tanto, puede que sea poco valorable. También obtuvo un mayor número de síntomas no motores con pruebas de imagen complementarias (RMN y DaT-SCAN) normales.

Con respecto al sujeto 267P, también se le había reconvocado en otras ocasiones y realizado los experimentos obteniendo resultados similares. Se le realizó también un estudio clínico exhaustivo y a diferencia del 277R, no presentaba antecedentes neurológicos de interés ni incongruencias en el resto de exploraciones realizadas. Estos sujetos, junto a los restantes con valores de captación específica “patológicos” se les priorizará para un seguimiento clínico evolutivo.

Finalmente recordar el caso del sujeto 895B con el antecedente de depresión endógena, que presentaba un contenido basal de 5-HT bajo, pero una captación total y una captación específica en principio normales, pudiendo poner de manifiesto que estos mecanismos no estuvieran dañados en este sujeto con dicho antecedente psiquiátrico, aunque se requieren más ensayos sobre el tema para obtener hallazgos más concluyentes.

## 5. Establecimiento de nuevos umbrales

Una vez introducidos los datos de aquellos sujetos reconvocados, así como de nuevos voluntarios se fijaron nuevos criterios umbrales (**Tabla 4**). Como se puede observar, estos apenas han sufrido cambios desde el periodo 2019-2021, poniendo de manifiesto la robustez del método utilizado por nuestro laboratorio.

		Mean	SD	Umbral		Mean	SD	Umbral
Ctrl basal	<b>2019-2021</b>	3,10	1,34	<b>1,76</b>	<b>2022</b>	3,10	1,35	<b>1,76</b>
PD basal		1,47	1,23	2,70		1,47	1,23	2,70
Ctrl Utpk		11,62	3,71	<b>7,91</b>		11,67	3,69	<b>7,98</b>
PD Utpk		7,34	2,56	9,91		7,34	2,56	9,91
Ctrl Utpk spc		8,79	2,11	<b>6,68</b>		8,79	2,11	<b>6,68</b>
PD Utpk spc		4,15	1,68	5,83		4,15	1,68	5,83

Se muestran la media (Mean) y su correspondiente desviación estándar (SD), expresados en nmol/mg proteína, para voluntarios clínicamente sanos (Ctrl) y pacientes con enfermedad de Parkinson (PD). Basal: contenido nativo de serotonina (5-HT); Utpk: captación total de 5-HT; Utpk spc: captación específica de 5-HT. A la izquierda se muestran los umbrales establecidos en el periodo comprendido entre 2019-2021. A la derecha, los establecidos en 2022 tras introducir los datos de aquellos sujetos reconvocados, así como de nuevos voluntarios, observándose escasas variaciones con respecto a años anteriores.

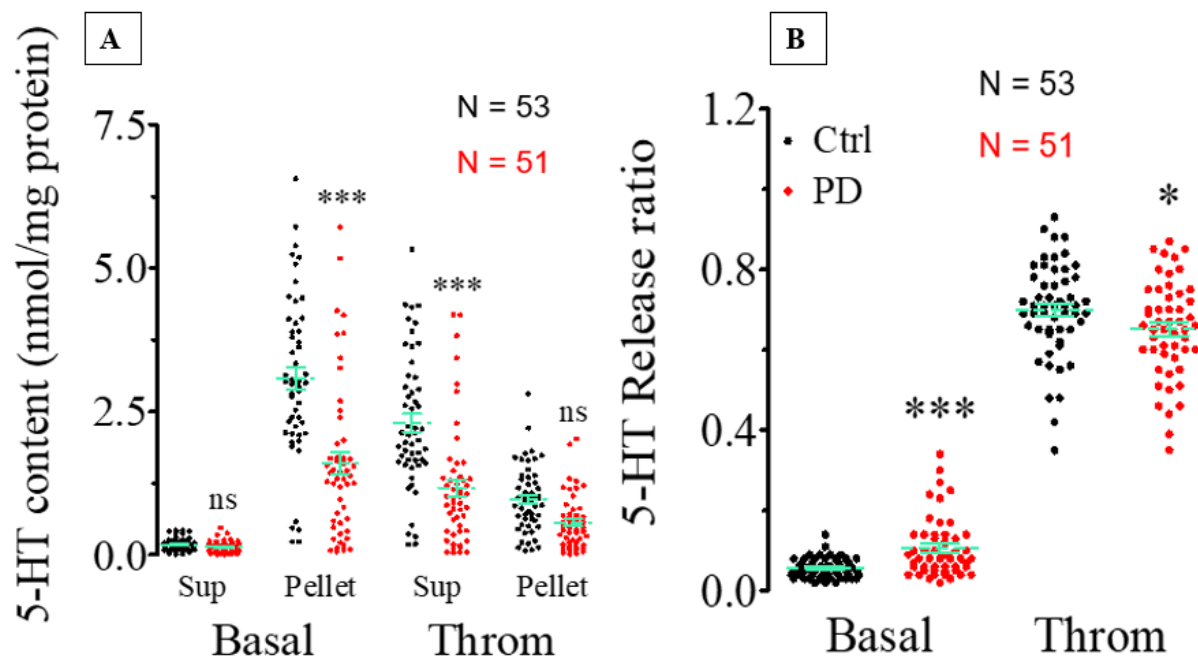
## 6. Análisis de la liberación de serotonina en gránulos densos plaquetarios

Las plaquetas liberan serotonina (5-HT) por exocitosis cuando se incuban con secretagogo fisiológico como es la trombina (Throm). Ésta produce una rápida respuesta secretora que normalmente dura menos de 20 segundos, de manera que la liberación de 5-HT (Release) en respuesta a 4 U/mL de trombina se puede estimar. Como se observa en los diagramas de puntos de **fig.16** las plaquetas de pacientes con enfermedad de Parkinson (PD) liberan significativamente

menor cantidad de 5-HT que aquellas de voluntarios sanos (Ctrl) (A). Además, resulta llamativo cómo en los gránulos plaquetarios de PD se produce una mayor “fuga” (difusión pasiva o pérdida inespecífica) de 5-HT en ausencia de estímulo, que en Ctrl (B).

Estos datos podrían indicar que en los gránulos de PD los mecanismos para retener las aminas almacenadas (entre ellas la 5-HT) puedan estar dañados, poniendo de manifiesto la descompartimentalización ya mencionada.

**Fig. 16| Liberación de serotonina**

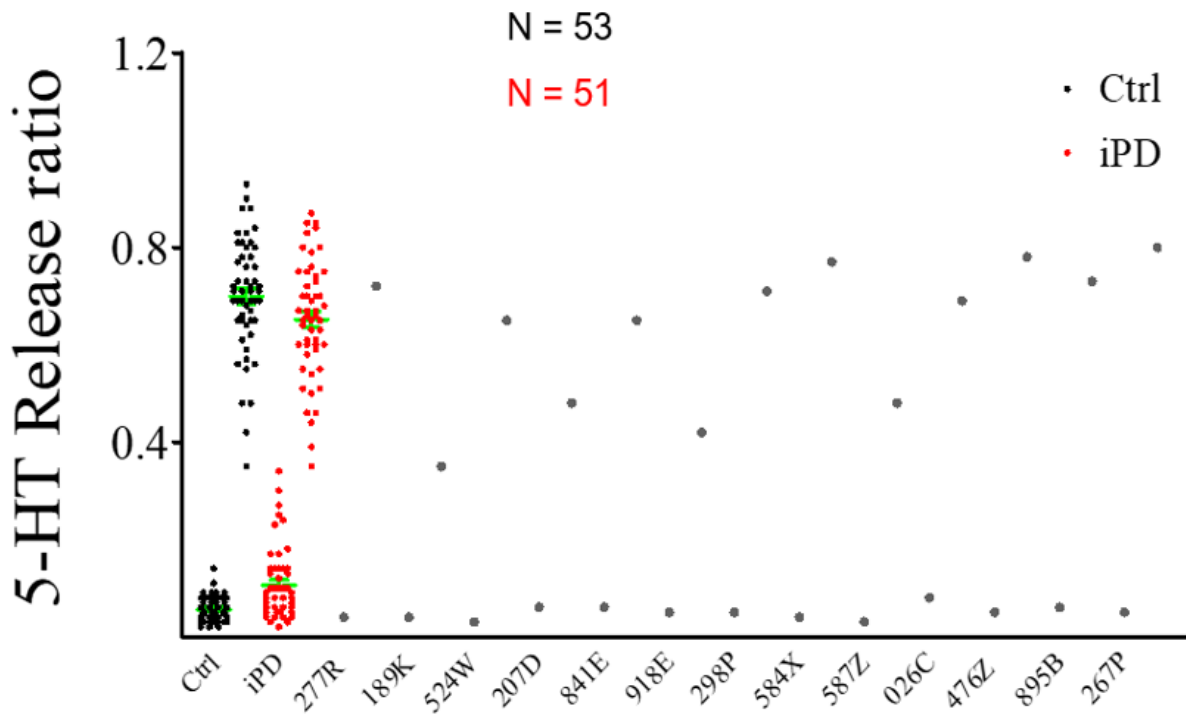


Mecanismos de liberación de 5-HT posiblemente dañados en plaquetas en pacientes con enfermedad de Párkinson (PD). **A:** La 5-HT se cuantificó en el sobrenadante (*Sup*) y el pellet de plaquetas se recuperó mediante centrifugación (pellet= 5-HT no secretada). Las plaquetas de sujetos sanos (*Ctrl*) y PD fueron estimuladas durante 90 segundos con trombina (4U/mL): ns, no significativo; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA). **B:** El ratio de liberación (liberación de 5-HT/(5-HT liberada + 5-HT restante) indicó que hubo una mayor “fuga” de 5-HT en plaquetas de PD pero menor liberación inducida por trombina ( $n=53$  en Ctrl,  $n=51$  en PD): ns, no significativo; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (T de Student para muestras independientes)

En la **fig. 17** se observa en la parte inferior de la gráfica, la difusión pasiva de 5-HT en gránulos densos plaquetarios, normal en los 13 sujetos sanos a estudio. En la parte superior de la misma, se representa la liberación de 5-HT inducida por Throm (liberación activa), en la que caben destacar a los sujetos 189K, 207D, 918E y 587Z, con una liberación inducida por Throm baja que se asemeja a la producida en iPD.

Si bien atendiendo a los antecedentes clínicos de estos sujetos se puede establecer cierto grado de correlación con estos datos, son necesarios más ensayos individuales al respecto para conocer el significado de estos resultados.

Fig. 17| Difusión pasiva y liberación activa de serotonina



En la parte inferior se representa la difusión pasiva de 5-HT en *Ctrl* (controles, voluntarios sanos), *iPD* (pacientes con enfermedad de Párkinson) y el resto representa a los 13 sujetos reconvocados y nuevos a estudio. En la parte superior, se representa la liberación activa de 5-HT, que es aquella inducida por trombina.



---

# CONCLUSIONES

---





1. Un 76% de sujetos con enfermedad de Parkinson (EP) presentan un contenido basal de serotonina (5-HT) bajo con respecto a controles, voluntarios clínicamente sanos (Ctrl). Deben tenerse en cuenta enfermedades como la depresión, con niveles basales de 5-HT bajos pero aparentemente “normales” en cuanto a captación total y captación específica de 5-HT. Esto último podría servir como base de cara a plantear ensayos más enfocados a este tema.
2. Un 57% de sujetos con EP presentan una captación total de 5-HT en plaquetas baja con respecto a Ctrl, aunque existe cierto solapamiento. Este solapamiento se logra corregir eliminando el componente inespecífico de la captación de manera que ahora un 97% de sujetos con EP presentan una captación de 5-HT intrínseca de gránulos de plaquetas baja con respecto a Ctrl, siendo este parámetro decisivo para establecer un posible diagnóstico.
3. La liberación de 5-HT inducida por trombina en plaquetas de pacientes con EP es significativamente menor que en Ctrl. Estos pacientes, a su vez, presentan una mayor difusión pasiva de 5-HT, que corrobora la descompartimentalización de este neurotransmisor en relación a la teoría aminérgica.
4. En vista de los datos obtenidos se plantea la conveniencia de realizar un seguimiento a aquellos sujetos reconvocados y nuevos que se sitúan en valores intermedios y patológicos en los diferentes experimentos realizados.
5. Dado que la neurodegeneración en la EP comienza décadas antes de la aparición de los síntomas motores y que la disfunción de las vesículas secretoras es posible que ocurran también antes de los primeros síntomas de la enfermedad, este "test de 5-HT en plaquetas" podría utilizarse para detectar casos de EP preclínico en sujetos sanos. Además, constituiría un método barato, fiable y relativamente rápido que podría implementarse en cualquier laboratorio.
6. Si estas hipótesis son ciertas, el conocimiento de los mecanismos de captación, acumulación y liberación de 5-HT en plaquetas a nivel periférico como reflejo de lo que sucede a nivel central en las neuronas nigrostriatales dopaminérgicas, podría iniciar la búsqueda de nuevos fármacos que actúen a estos niveles, pudiendo quizás en un futuro cambiar el curso de la enfermedad.



---

# PERSPECTIVAS FUTURAS

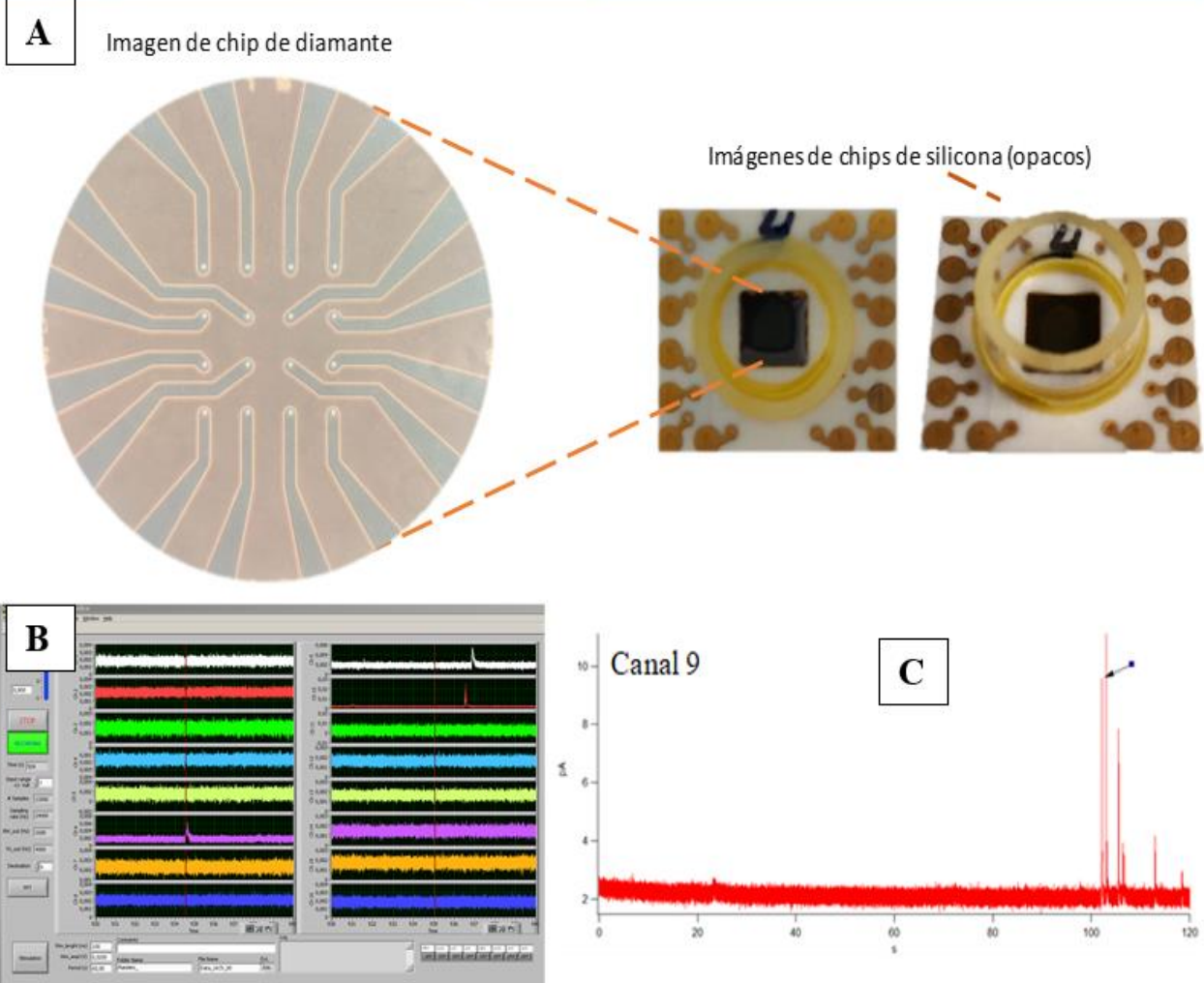
---

En la búsqueda de los mecanismos moleculares afectados en las vesículas secretoras, nuestro laboratorio ha demostrado la drástica reducción en los niveles de serotonina (5-HT) de las plaquetas de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), así como su captación intrínseca en gránulos densos y en la liberación de este neurotransmisor en respuesta a la estimulación. Se ha utilizado para tales tareas análisis realizados mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detección electroquímica (UPLC-ED).

Sin embargo, nuestro actual objetivo es introducir una técnica muy sensible para explorar mejor la cinética de la exocitosis mediante dispositivos de matriz de electrodos múltiples (MEA) basados en electrodos de diamante o grafito para la detección amperométrica de la liberación de aminas (**Fig. 18**). Los dispositivos multicanal son necesarios ya que se necesitan aproximadamente 200 picos amperométricos de células que solo contienen 4-8 gránulos, pero ya se está logrando la adhesión de más de una plaqueta a cada electrodo. La plataforma MEA es adecuada para ejecutar protocolos automatizados sincronizados con precisión, mejorando tanto el rendimiento de los datos como la consistencia de los resultados.

Actualmente, se están obteniendo unos resultados muy prometedores con esta técnica en la ULL y nuestra intención es crear una nueva herramienta de diagnóstico para su uso general en laboratorios hospitalarios mediante la construcción de un aparato independiente para estudiar simultáneamente las características secretoras de muchas plaquetas para el diagnóstico directo de la EP.

**Fig. 18| Multi-Electrode Array (MEA)**



**A:** Imagen microscópica (izquierda) de un chip de diamante con sus 16 electrodos y macroscópica (derecha) de un chip de silicóna, que son los que se utilizan actualmente. **B:** Registro simultáneo de espigas en una macro del programa *Labview*. **C:** Ejemplo de espiga en el canal 9. Cada espiga se corresponde con la liberación de un gránulo denso plaquetario.

---

# ¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG?

---

Durante este TFG he podido aprender no sólo de la parte clínica en el hospital sino también de la de laboratorio, hasta el momento prácticamente desconocida para mí. En este sentido, una de las cosas que más me han llamado la atención ha sido todo el trabajo que se esconde tras un número: aislamiento de plaquetas, normalización de las muestras para conteo, numerosas centrifugaciones, sistemática de pasos y condiciones rigurosas, experimentos de captación y liberación, amperometría multielectrodo...

Esto me ha hecho reflexionar y apreciar más los resultados de cualquier prueba de laboratorio, tanto a nivel de nuestro estudio como de otros o de los que se obtienen en el hospital. Asimismo, el Dr. Pablo Montenegro y su equipo me ha enseñado cómo usar los diferentes instrumentos de laboratorio y aparatos (centrífuga, lector de placas, turbidímetro, cromatografía líquida de ultra-alta resolución...), así como a preparar soluciones o analizar datos.

En lo que se refiere a mi desempeño en el hospital, he podido acompañar a la Dra. Mercedes Pueyo en las consultas de Neurología del HUC y aprender a través de ella las bases de una buena historia clínica en pacientes con EP y otros trastornos del movimiento, centrándonos especialmente en la exploración física y en la interpretación de pruebas de imagen.

Además, ha supuesto todo un reto el contactar con los participantes y acordar una fecha para las visitas, además de servir como enlace entre el hospital y el laboratorio según la disponibilidad de estos y más dificultado por la situación epidemiológica de la COVID-19 en el momento de la realización del presente trabajo.

Por último, agradecer, aparte de a mis tutores (Dr. Pablo Montenegro, Dra. Mercedes Pueyo) por sus conocimientos y sobre todo por su paciencia, al Dr. Borges por su asesoramiento, a Alicia Méndez González por ser mi profesora y compañera de laboratorio y al equipo de enfermería del HUC encabezado por Olivia Cruz Cordobés por ayudarnos con las extracciones.



---

# BIBLIOGRAFÍA

---





1. Sociedad Española de Neurología (SEN). 2019. Guía oficial de práctica clínica en Parkinson.
2. Lee, A., & Gilbert, R. M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic clinics*, 34(4), 955–965. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>.
3. Atik, A., Stewart, T., & Zhang, J. (2016). Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 26(3), 410–418.
4. Stefanis L. (2012).  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), a009399.
5. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008 Jun;34(3):284-95.
6. Kahle P. J. (2008). alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica*, 115(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0302-x>.
7. Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2015 Jan 15;277:136-45. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.037. Epub 2014 Jul 31. PMID: 25086269.
8. Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neuroscience bulletin*, 33(5), 585–597.
9. Goldstein, D. S., Sullivan, P., Holmes, C., Miller, G. W., Alter, S., Strong, R., Mash, D. C., Kopin, I. J., & Sharabi, Y. (2013). Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 126(5), 591–603. <https://doi.org/10.1111/jnc.12345>
10. Reeve, A.K., Grady, J.P., Cosgrave, E.M. et al. Mitochondrial dysfunction within the synapses of substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease* 4, 9 (2018).
11. Zhen Qi, Gary W. Miller, Eberhard O. Voit (2008). Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism. *PLoS ONE* 3, e2444.
12. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (September 2004). “Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine”. *Pharmacological Reviews*. 56 (3): 331-49.
13. Seeman P (2009). “Chapter 1: Historical overview: Introduction to the dopamine receptors”. In Neve K (ed). *The Dopamine Receptors*. Springer. pp. 1-22.
14. Bisaglia, M., Mammi, S., Bubacco, L. (2007). Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine. *J Biol Chem*, 282, 15597-15605.
15. 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 Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 155, 96-119.

16. Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23, 177–189.
17. Fitch-Tewfik, J. L., Flaumenhaft, R. (2013). Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front Endoc.* 4, Jun 26;4:77.
18. Sharda, A., Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000Research*, 7, 236-236.
19. Brunk, I., Höltje, M., von Jagow, B., 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. *Handbook of experimental pharmacology*, (175), 305–325.
20. Fitch-Tewfik, J. L., & Flaumenhaft, R. (2013). Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Frontiers in endocrinology*, 4, 77.
21. DaT-SCAN. (2022, 10 febrero). European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/datscan>.
22. Figueroa A.E., Borges R., Montenegro P. M (2018). El análisis funcional de las plaquetas para el diagnóstico de enfermedades neurológicas. Trabajo de Fin de Grado.
23. Medina C.H., Borges R., Montenegro P. M (2019). Serotonin analysis in human platelets for the early diagnosis of Parkinson's disease. Trabajo de Fin de Grado.
24. Montenegro, P., Pueyo, M., Lorenzo, J. N., Villar-Martinez, M. D., Alayón, A., Carrillo, F., & Borges, R. (2022). A Secretory Vesicle Failure in Parkinson's Disease Occurs in Human Platelets. *Annals of neurology*, 91(5), 697–703. <https://doi.org/10.1002/ana.26335>.
25. Cataldo, L. R., Suazo, J., Olmos, P., Bravo, C., Galgani, J. E., Fex, M., Martínez, J. A., & Santos, J. L. (2019). Platelet Serotonin Levels Are Associated with Plasma Soluble Leptin Receptor Concentrations in Normoglycemic Women. *Journal of diabetes research*, 2019, 2714049. <https://doi.org/10.1155/2019/2714049>.
26. Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197–211.
27. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Jan;22 Suppl 1:S119-22.
28. Doty R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature reviews. Neurology*, 8(6), 329–339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>.

29. Casjens, S., Eckert, A., Woitalla, D., Ellrichmann, G., Turewicz, M., Stephan, C., Eisenacher, M., May, C., Meyer, H. E., Brüning, T., & Pesch, B. (2013). Diagnostic value of the impairment of olfaction in Parkinson's disease. *PLoS one*, 8(5), e64735.
30. Morales-Briceño, H., Cervantes-Arriaga, A., & Rodríguez-Violante, M. (2011). Diagnóstico premotor de la enfermedad de Parkinson [Premotor diagnosis of Parkinson's disease]. *Gaceta medica de Mexico*, 147(1), 22–32.
31. Tolosa, E., Compta, Y., & Gaig, C. (2007). The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 13 Suppl, S2–S7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2007.06.007>.
32. Hely, M. A., Reid, W. G., Adena, M. A., Halliday, G. M., & Morris, J. G. (2008). The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 23(6), 837–844. <https://doi.org/10.1002/mds.21956>.
33. Kurtis, M. M., Rodriguez-Blazquez, C., Martinez-Martin, P., & ELEM Group (2013). Relationship between sleep disorders and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 19(12), 1152–1155. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.07.026>.
34. H.-S. Kim, S.-M. Cheon, J.-W. Seo, H.-J. Ryu, K.-W. Park, J.W. Kim, Nonmotor symptoms more closely related to Parkinson's disease: comparison with normal elderly, *J. Neurol. Sci.* 324 (2013) 70-73.
35. S. Krishnan, G. Sarma, S. Sarma, A. Kishore, Do nonmotor symptoms in Parkinson's disease differ from normal aging? *Mov. Disord.* 26 (2011)2110-2113.
36. T.K. Khoo, A.J. Yarnall, G.W. Duncan, S. Coleman, J.T. O'Brien, D.J. Brooks, et al., The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease, *Neurology* 80 (2013) 276-281.
37. Mustapha, M., & Mat Taib, C. N. (2021). MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 21(4), 422–433.
38. Jones, D. R., Moussaud, S., & McLean, P. (2014). Targeting heat shock proteins to modulate  $\alpha$ -synuclein toxicity. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 7(1), 33–51.
39. Isolation of human platelets from whole blood [Internet]. Abcam.com. 2022 [citado el 4 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.abcam.com/protocols/isolation-of-human-platelets-from-whole-blood>

40. Santos-García, D., Mir, P., Cubo, E. et al. COPPADIS-2015 (COhort of Patients with PARKinson's DIsease in Spain, 2015), a global –clinical evaluations, serum biomarkers, genetic studies and neuroimaging– prospective, multicenter, non-interventional, long-term study on Parkinson's disease progression. *BMC Neurol* 16, 26 (2016).
41. Vasudevan DM; Sreekumari S; Kannan V (2010). *Textbook of Biochemistry for Medical Students (6th ed.)*. Jaypee Medical Publishers. ISBN 9350250160.
42. Tuomisto J, Tukiainen E. Decreased uptake of 5-hydroxytryptamine in blood platelets from depressed patients. *Nature* 1976; 262: 596– 598. <https://doi.org/10.1038/262596a0>.



