

Dr. Ricardo Borges Jurado, coordinador del Grupo de Investigación “*Mecanismos para la acumulación de neurotransmisores en la vesícula secretora y sus consecuencias fisiopatológicas*” y Dr. Pablo Manuel Montenegro Escudero, adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICO /CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “*Una disfunción en el gránulo denso plaquetario como posible diagnóstico preclínico y diferencial de la Enfermedad de Parkinson*” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D^a Alicia Méndez González, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2021/2022.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 30 de junio de 2022.

Dr. Ricardo Borges Jurado.

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado. Edificio Central. Campus Central. 38071 La Laguna.
C/ Delgado Barreto S/N. Tfno. (00 34) 922 31 9000
<http://www.esuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/Inicio> · master@ull.es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 4595384 Código de verificación: KPm/+dHH

Firmado por: Ricardo Borges Jurado
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 30/06/2022 13:47:52

Pablo Manuel Montenegro Escudero
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

30/06/2022 13:48:34



**Facultad de
Ciencias de la Salud**
Universidad de La Laguna



**Máster en
Biomedicina**

Una disfunción en el gránulo denso plaquetario como posible diagnóstico preclínico y diferencial de la Enfermedad de Parkinson

*Mecanismos para la acumulación de
neurotransmisores en la vesícula
secretora y sus consecuencias
fisiopatológicas*

AUTOR - Alicia Méndez González

DIRECTOR – Ricardo Borges Jurado

CODIRECTOR – Pablo Manuel Montenegro Escudero

Este Trabajo Final de Máster se ha realizado bajo la tutela y paciencia de Dr. Ricardo Borges Jurado y Dr. Pablo Manuel Montenegro Escudero, quienes me han guiado en mi aprendizaje y desempeño académico.

He de mencionar a todos los voluntarios que de buen grado han participado en la realización del proyecto, ya que, sin ellos, difícilmente habría sido posible la obtención de estos resultados y conclusiones, así como a los equipos de Neurología y Enfermería participantes, particularmente a Dra. Mercedes Pueyo y a Iván González-Arvelo por su especial implicación.

Por último, agradecer, aparte de a mis tutores (Dr. Ricardo Borges Jurado, Dr. Pablo Montenegro), al Departamento de Farmacología y Medicina Física, quienes me han enseñado mucho en el ámbito del manejo del laboratorio, tanto como profesores como compañeros, y han generado un gran ambiente de trabajo.

Los datos y participantes aquí analizados y expuestos están recogidos parcialmente en un artículo publicado por P. Montenegro et al. el pasado mayo de 2022 en *Annals of Neurology*, en el que he tenido participación y he basado mi Trabajo Fin de Máster. Mi labor y desempeño durante este curso académico ha contribuido a dicha publicación, que lleva por título “*A Secretory Vesicle Failure in Parkinson's Disease Occurs in Human Platelets*”.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Resumen /Abstract | 1 |
| 2. Introducción..... | 3 |
| 3. Hipótesis y objetivos..... | 10 |
| 4. Material y métodos..... | 12 |
| a. Pacientes y criterios de inclusión..... | 13 |
| b. Purificación de plaquetas..... | 14 |
| c. Preparación de muestras..... | 15 |
| d. Cuantificación de proteínas..... | 16 |
| e. Análisis de serotonina por UPLC..... | 16 |
| f. Soluciones empleadas en el estudio..... | 18 |
| g. Materiales y reactivos..... | 18 |
| 5. Resultados..... | 19 |
| a. Deterioro de la captación de serotonina en plaquetas con EP..... | 20 |
| b. Determinación de la captación intrínseca vesicular..... | 22 |
| c. Valoración de casos subclínicos y ‘outliers’..... | 26 |
| d. Valoración de parkinsonismos secundarios..... | 27 |
| e. Mecanismos de liberación de serotonina..... | 29 |
| 6. Discusión..... | 31 |
| a. Deterioro de la captación de serotonina en plaquetas con EP..... | 33 |
| b. Determinación de la captación intrínseca vesicular..... | 33 |
| c. Diagnóstico preclínico y ‘outliers’..... | 34 |
| d. Valoración de parkinsonismos secundarios..... | 35 |
| e. Mecanismos de liberación de serotonina..... | 36 |
| f. Reflexiones finales..... | 36 |
| 7. Conclusiones..... | 38 |
| 8. Bibliografía..... | 41 |
| 9. Material suplementario..... | 46 |

RESUMEN

Objetivo: La presencia de elevados niveles de dopamina (DA) y sus principales metabolitos en el citosol de las neuronas se ha asociado con su vulnerabilidad en la enfermedad de Parkinson (EP). Más del 99% de las aminas biógenas de la célula están confinadas en las vesículas secretoras (VS), siendo estructuras fundamentales en la regulación de la DA. Las VS de las plaquetas utilizan mecanismos similares, si no los mismos, para la captación, acumulación y liberación de serotonina que las existentes en neuronas dopaminérgicas. Por tanto, cualquier defecto funcional en las plaquetas probablemente refleje los eventos acontecidos en estas neuronas.

Métodos: Se aislaron plaquetas de la sangre periférica de 80 pacientes con EP, 123 controles clínicamente sanos y 29 pacientes con otros síndromes parkinsonianos, analizando su comportamiento con la serotonina mediante UPLC-ED: contenido nativo, capacidad de acumulación, y liberación.

Resultados: Existe una disminución en el contenido de serotonina y la captación por parte de las VS de plaquetarias, así como una disminución de la liberación de este neurotransmisor, en pacientes con EP, pero no en la mayoría de los casos de parkinsonismo, ni controles clínicamente sanos.

Interpretación: Estos hallazgos indican un deterioro funcional en el manejo de aminas biógenas por las VS plaquetarias de pacientes con EP. La determinación de este defecto y el enfoque descrito en el presente estudio podría usarse potencialmente como biomarcador para la detección subclínica y diferencial de la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

Objective: The presence of high levels of dopamine (DA) and its main metabolites in the cytosol of neurons has been associated with their vulnerability in Parkinson's disease (PD). More than 99% of the biogenic amines in the cell are confined in the secretory vesicles (SVs), being fundamental structures in the regulation of DA. Platelet SVs use similar, if not the same, mechanisms for serotonin uptake, accumulation, and release as dopaminergic neurons. Therefore, any functional defect in platelets probably reflects the events happening in these neurons.

Methods: Platelets were isolated from the peripheral blood of 80 patients with PD, 123 clinically healthy controls and 29 patients with other parkinsonian syndromes, analyzing their serotonin behavior by UPLC-ED: naïve content, uptake, and release.

Results: There is a decrease in serotonin content and uptake by platelet SVs, as well as a decrease in the release of this neurotransmitter, in patients with PD, but not in most cases of parkinsonism, nor controls clinically healthy.

Interpretation: These findings indicate a functional impairment in the handling of biogenic amines by the platelet SVs of patients with PD. The determination of this defect and the approach described in the present study could potentially be used as a biomarker for subclinical and differential detection of Parkinson's disease.

INTRODUCCIÓN

Después de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson (EP) es el desorden neurodegenerativo más común en la población, siendo la mayor parte de carácter idiopático (Poewe et al., 2017), solo explicándose un 10% de los casos por origen familiar. No presenta una incidencia homogénea en la población, sino que su distribución varía claramente en relación con el sexo y la edad. De esta forma, la EP aflora en personas mayores, encontrando que a partir de los 60 años se produce un aumento en la incidencia significativo. Así mismo, por cada caso descrito en mujeres encontramos entre 2 y 3 casos masculinos (Moisan et al., 2015; Elbaz et al., 2016).

Aunque la descripción clásica dada por James Parkinson en su ensayo publicado en 1817 se centra en los síntomas de carácter motor (disquinesia, temblor y rigidez), la EP cursa con síntomas no motores descritos más recientemente (García et al., 2010; Pont-Sunyer et al., 2015), incluyendo depresión, trastornos del sueño, anosmia, hipotensión ortostática y problemas digestivos, definiéndose actualmente como una disfunción del sistema de los ganglios basales debido a la depleción de dopamina (DA) (Martínez-Fernández et al., 2016). Estos síntomas no motores no pueden ser explicados

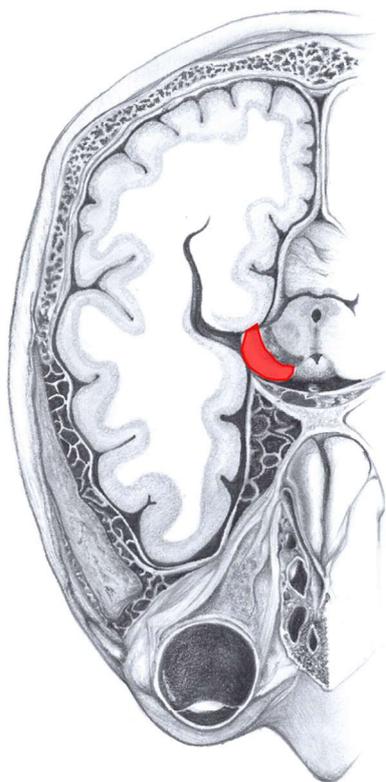


Figura 1 - Imagen anatómica de corte transversal de cráneo u **encéfalo humano.** El área resaltada en rojo corresponde a la localización de las neuronas DAérgicas nigrostriatales.

de forma exclusiva por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) nigrostriatales, indicando una entidad patológica de mayor amplitud. Igual que sucede con la incidencia de la EP en la población, existen diferencias significativas entre los sexos, de forma que la sintomatología motora en mujeres se caracteriza por temblores y en varones por rigidez. Además, la sintomatología no motora se presenta más severa en mujeres que en varones (Moisan et al., 2015; Laperle et al., 2020).

Normalmente, el diagnóstico de la EP se produce una vez los síntomas motores son notorios, lo que implica una degeneración promedio de entre el 70-80% de las neuronas DAérgicas nigrostriatales de forma irreversible (**Figura 1**) (Masato et al., 2019; Laperle et al., 2020). Sin embargo, es necesario anotar que los estados subclínicos de la enfermedad pueden comenzar mucho antes del diagnóstico final, ya que la

sintomatología no motora suele pasar desapercibida o catalogarse de forma distinta a un caso de EP (Pont-Sunyer et al., 2015). Esto es debido a que no se han desarrollado, hasta la fecha, test para la detección de la EP previa a la manifestación de los síntomas motores. (Moisan et al., 2015; Elbaz et al., 2016).

Entre los métodos de detección y diagnóstico de la EP se encuentra el DaTSCAN (**Figura 2**), una técnica de neuroimagen capaz de captar la señal emitida por la actividad del transportador de dopamina (DAT) de forma específica por medio de la administración intravenosa de 123-ioflupano, un componente radiactivo (Peñas Domingo et al., 2015). Una señal alta indica que la actividad dopaminérgica está razonablemente conservada, mientras que una señal baja sugiere una disminución de la actividad de las neuronas dopaminérgicas presente en la enfermedad de Parkinson y otros síndromes parkinsonianos. De esta forma, una disminución en la señal detectada es indicativo diagnóstico de la EP.

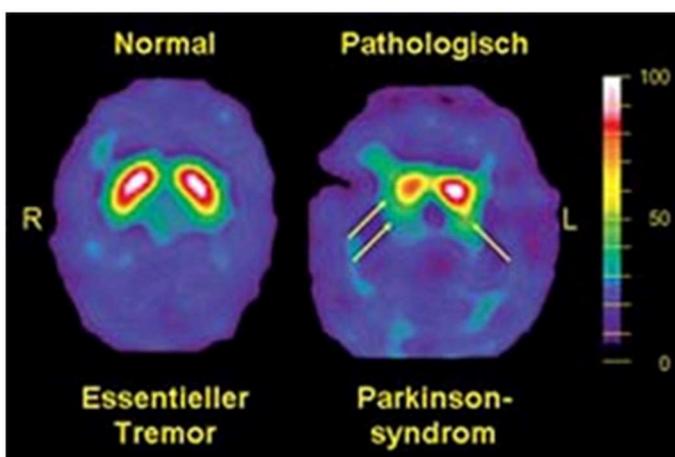


Figura 2 - Imagen diferencial en DaTSCAN entre un individuo control frente a un paciente con Enfermedad de Parkinson (EP). Se aprecia una notable pérdida de la actividad del transportador de dopamina (DAT) en el paciente con EP frente a un diagnóstico diferencial de un paciente con temblor esencial, que presenta una actividad de DAT no patológico.

No obstante, el coste de esta técnica es elevado frente a una larga lista de espera (Bajaj, 2010), que no siempre se refleja en un diagnóstico claro. Como añadido, y además de su carácter invasivo, esta técnica no siempre aporta resultados concluyentes, catalogándose como, etapas diferenciables en las que se valora el nivel de actividad y la bilateralidad de esta. Así, siendo la técnica más específica

existente, está muy lejos de ofrecer información temprana y contundente para diagnóstico, haciendo necesaria la investigación y el desarrollo de métodos de estudio y de diagnóstico alternativos.

Una de las hipótesis sobre el origen patogénico de la EP es la teoría aminérgica. Las aminas biógenas, entre las que se encuentra la DA, son almacenadas en las vesículas secretoras (VS), donde son acumuladas y protegidas de su degradación citosólica a especies reactivas del oxígeno. En condiciones de reposo, la pérdida

irreversible de DA en las neuronas está relacionado, de forma mayoritaria, por una fuga (*leakage*) pasivo de esta amina desde las VS hacia el citosol, quedando expuesta a su degradación en DOPAL, un catecolaldehído, por medio de la monoaminoxidasa (MAO) vía desaminación. El DOPAL es un compuesto que induce neurotoxicidad por medio de cuatro mecanismos: induce el cross-linking proteico de la α -synucleína y la formación de cuerpos de Lewy, descomposición a quinonas, producción de radicales hidroxilo y fomenta el aumento de toxicidad por otros agentes, como el DOPAC (Figura 3). El aumento del estrés oxidativo y de agentes neurotóxicos conduce a la muerte celular y, en última instancia, a la degeneración de la sustancia nigra, induciendo la patogénesis de la EP (Goldstein et al., 2013; Meiser JW., 2013).

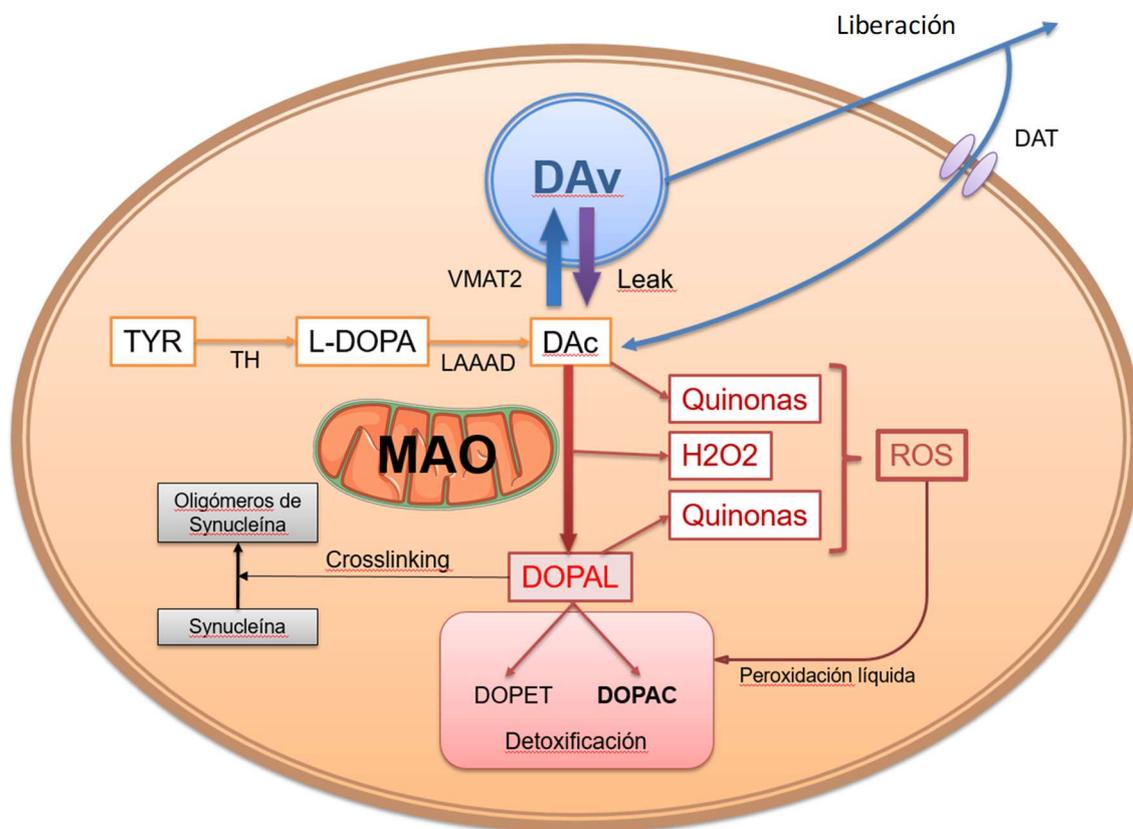


Figura 3 - Metabolismo de la dopamina (DA) en la neurona. La DA se almacena en las vesículas de secreción (DAv) en altas concentraciones. Existen procesos de entrada, tanto activa como pasiva, y de salida, principalmente pasiva (Flechas azul y violeta). La DAv será liberada en la sinapsis neuronal y parcialmente recaptada por el transportador de dopamina (DAT) al citoplasma (DAc), ruta designada en azul. El DAc tiene un carácter citotóxico, debido a las rutas de degradación mediadas por la monoaminoxidasa (MAO). La ruta de degradación de MAO produce como resultado final el DOPAL, el cual se descompone parcialmente en quinonas, igual que la DAc. Así mismo, la propia ruta de MAO genera peróxido de hidrógeno H₂O₂. Tanto las quinonas como el H₂O₂ derivan en especies reactivas del oxígeno (ROS). Las rutas de degradación están designadas en rojo. El DOPAL interfiere en el plegamiento proteico, lo que explica el crosslinking proteico en la α -synucleína, derivando en la formación de los oligómeros descritos como Cuerpos de Lewy en la EP. Imagen modificada de Goldstein et al., 2013.

Las VS tienen la capacidad de captar y almacenar grandes concentraciones de estas aminas, constituyendo los mayores gradientes osmóticos conocidos a través de membranas biológicas. En cultivos cromafines murinos y bovinos, se ha cuantificado una concentración de catecolaminas intravesicular de 0.8 M (Montesinos et al., 2008) y 1 M (Albillos et al., 1997), respectivamente. Así mismo, en las propias VS de las neuronas DAérgicas nigrostriatales encontramos una concentración de DA de 1 M (Omiatek et al., 2013), en contraste con una concentración citosólica de 4-50 μ M en las mismas (Mosharov EV. et al., 2003). Esto sugiere que el 99.9% de la DA se encuentra almacenada en VS.

Las células secretoras están presentes en distintos tejidos y sistemas, encontrándose, generalmente, hacinadas en regiones concretas. Las células cromafines están localizadas en la médula de las glándulas suprarrenales y los mastocitos, en la médula ósea. Estos tipos celulares, si bien se comportan modelos de captación, almacenamiento y liberación de catecolaminas aceptables para el estudio indirecto de las neuronas DAérgicas, los mecanismos de extracción son complejos o invasivos, por lo que resultó de interés el empleo de las plaquetas humanas.

Las plaquetas representan el mayor reservorio de serotonina (>99 %) en sangre, quedando almacenada en sus VS. Estas células carecen de metabolismo propio, siendo estrictamente fragmentos celulares por lo que no son capaces de sintetizar este neurotransmisor, sino que lo captan desde el plasma por medio del transportador SERT. Las plaquetas contienen principalmente tres tipos de gránulos: gránulos α , gránulos δ y lisosomas. 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. Los gránulos δ , a partir de ahora denominados VS, son menos abundantes (aproximadamente 3-8 por plaqueta) y contienen en su interior altas concentraciones de cationes, polifosfatos, nucleótidos de adenina y 5-HT 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).

Tanto las VS de las células cromafines como las propias de plaquetas están clasificadas como compartimentos ácidos (**Figura 4**). Las ATPasas vesiculares son responsables de la entrada de H^+ , formando y manteniendo un gradiente de pH (pH vesicular de 5,5 frente al citosólico, ≈ 7) y un potencial de membrana (Ψ , +80 mV) como motor para el funcionamiento de los transportadores de membrana, tanto de aminas biógenas como de Ca^{2+} .

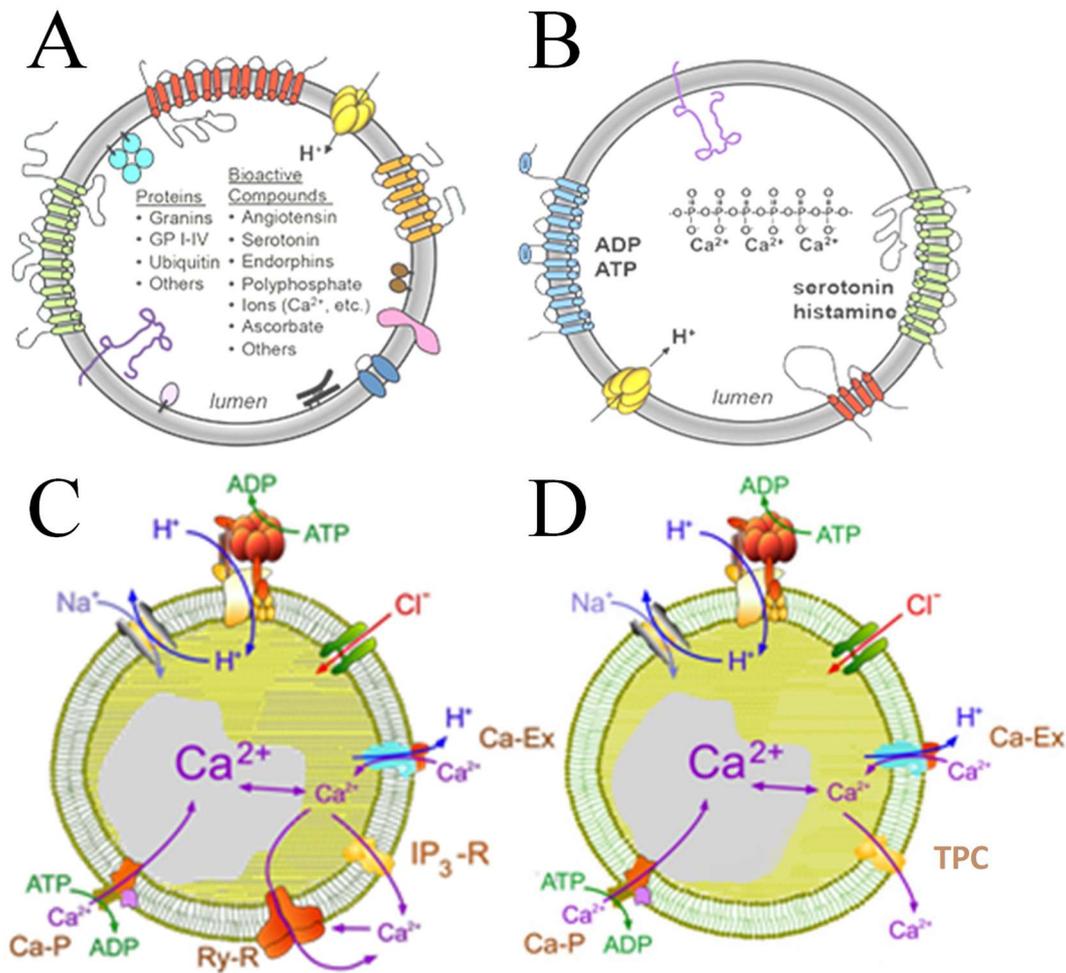


Figura 4 - Las vesículas secretoras (VS) de las células cromafines (A y C) y las plaquetas (B y D) comparten el mecanismo de captación y acumulación de aminas. Funcionalmente, los gránulos densos de los tipos celulares neuroendocrinos (panel A) presentan similitudes con los de las plaquetas (panel B). El sistema VMAT2 (panel A rojo; panel B verde) es el encargado de la captación de catecoles e indoles, en colaboración con la V-ATPasa de H^+ que hidroliza un ATP y bombea un H^+ hacia la luz de la matriz (amarillo). Otros sistemas que se muestran son el VNUT responsable de la captación de ATP (panel A verde; panel B azul) y diversos sistemas intercambiadores y transportadores iónicos de Cl^- y Na^+ (ó K^+) que se utilizan para equilibrar los gradientes electroquímicos. Las aminas forman complejos con ATP y otros componentes luminales para reducir las fuerzas osmóticas, incluso cuando se acumulan en concentraciones muy altas. Los paneles inferiores muestran la homeostasis de Ca^{2+} en los VS neuroendocrinos (panel C) y plaquetas (panel D), siendo orgánulos cruciales para el almacenamiento de este segundo mensajero: Intercambiador H^+/Ca^{2+} (CaEx), el receptor IP_3 (IP_3 -R), la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} del receptor de rianodina (Ry-R), el canal de dos poros (TPC) y la bomba de Ca^{2+} (Ca-P) dependiente de ATP (Machado et al., 2009; Rosado JA., 2011; Domínguez et al., 2014; Estévez-Herrera et al., 2016). Imagen modificada de Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013.

La captación de aminas biógenas desde el citosol hacia el interior de los VS, se produce a través del transportador VMAT (*Vesicular Monoamine Transporter*). Otro sistema presente en los gránulos es el transportador de nucleótidos vesicular VNUT (*Vesicular Nucleotide Transporter*), responsable de la acumulación de ATP en el lumen vesicular, relacionado con la estabilidad de la matriz vesicular para la alta acumulación de solutos. Los mecanismos de captación y almacenamiento de aminas biógenas (DA, 5-HT, adrenalina...) por las VS están ampliamente conservadas entre los distintos grupos celulares de secreción, siendo similares si no idénticos (Winkler H., 1997; Brunk et al., 2006; Pereira DB., 2012; Fitch-Tewfik & Flaumenhaft, 2013).

Debido a su fácil obtención, por extracción de sangre, estas células constituyen un posible modelo neuronal ya siendo biomarcadores útiles en el diagnóstico de otras enfermedades, como en la depresión mayor o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Deupree et al., 2006; Aleksovski et al., 2017). Atendiendo a la teoría aminérgica del origen de EP, la disfunción de las VS plaquetarias con la 5-HT 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 dicha enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presencia de elevados niveles de dopamina (DA) y sus principales metabolitos en el citosol de las neuronas se ha asociado con su vulnerabilidad en la enfermedad de Parkinson (EP), siendo una firme hipótesis de la patogénesis posiblemente preclínica de dicha enfermedad. Las vesículas secretoras (VS) de las plaquetas utilizan mecanismos similares, para la captación, acumulación y liberación de serotonina (5-HT) que las existentes en neuronas dopaminérgicas. Un fallo en estos mecanismos a nivel de las neuronas DAérgicas puede verse reflejado en las plaquetas humanas, proponiéndose un modelo de estudio de la EP directamente en paciente *in vivo*.

De esta forma, se toma como hipótesis valorar la viabilidad de los mecanismos de captación y liberación vesicular de 5-HT en plaquetas como biomarcador diagnóstico preclínico de la EP.

El objetivo principal del presente proyecto es el estudio de los mecanismos vesiculares de 5-HT en plaquetas humanas aisladas de pacientes con EP con respecto a voluntarios clínicamente sanos. A su vez este objetivo se compone de los siguientes apartados:

1. Establecer y comparar el contenido vesicular de 5-HT en pacientes de EPi, frente a otros síndromes parkinsonianos y voluntarios clínicamente sanos.
2. Determinar las diferencias en la capacidad de captación vesicular de 5-HT entre pacientes de EPi, de otros síndromes parkinsonianos y voluntarios clínicamente sanos.
3. Calcular y comparar la liberación estimulada por secretagogo para cada uno de los grupos de estudio.
4. Correlacionar los datos clínicos con los resultados individuales obtenidos y estimar la bondad de este estudio como posible biomarcador para la detección preclínica y diferencial de la EP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y criterios de inclusión

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna (CEIBA2017-0244) y por el Comité Ético del Servicio Canario de Salud (CHUC_2020_08). Los pacientes de Enfermedad de Parkinson (EP), otros trastornos del movimiento e individuos sanos fueron reclutados para el estudio en los Departamentos de Neurología del Hospital Universitario de Canarias (HUC) y en el Hospital Universitario de Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) por el equipo de neurología que participó en el proyecto.

Los participantes recibieron de antemano un documento informativo, que fue explicado punto por punto para confirmar su entendimiento, por parte del propio participante o responsable y posteriormente se realizó por escrito un consentimiento informado, recogido por el investigador el día de la toma de la muestra.

Las muestras de sangre son identificadas por códigos para asegurar el anonimato de los participantes, conformado por las tres últimas cifras y la letra del DNI, o por los tres últimos dígitos del pasaporte. Toda la información personal de los pacientes y controles fue recogida exclusivamente por el equipo de neurólogos que participó en el proyecto, llegando al laboratorio las muestras acompañadas del código, realizándose un análisis “a ciegas” de cada participante. Una vez completado el estudio de cada paciente o control fueron clasificados como (i) paciente de EPi, (ii) paciente de parkinsonismo o (iii) control. Los pacientes fueron diagnosticados por los Departamentos de Neurología del HUC y del HUNSC, fundamentalmente, basándose en los criterios clínicos, farmacológicos y DaTSCAN de haberse realizado.

Criterios de inclusión

Tanto los pacientes como los controles emparejados incluidos en el proyecto han debido cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

1. Pacientes diagnosticados con EP u otro trastorno motor por un neurólogo, pero no limitado a: atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, parkinsonismos secundarios (causas vasculares, farmacológicas, traumáticas, etc.) o temblor esencial.
2. Edad mínima de participación de 18 años, no existiendo una edad máxima para la inclusión en el estudio.

3. Los participantes deben ser capaces de aportar el consentimiento informado firmado, indicando que el participante (o el responsable legal) han sido debidamente informados de todos los aspectos relacionados con el estudio.

Criterios de exclusión

No fueron incorporados al proyecto aquellas personas que:

1. No entienden alguno o todos los términos del estudio.
2. No cumplen con las visitas organizadas para la realización del estudio.
3. Presentan antecedentes de enfermedad psiquiátrica, abuso de drogas ilegales o apoyo insuficiente en el entorno familiar y social del participante que llevó al investigador a considerar que no podría realizar el estudio.
4. Cualquier otra condición no compatible con el proyecto a determinar por el equipo investigador.

Cumplimiento de buenas prácticas clínicas

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre Principios Éticos para la Investigación Médica en Humanos, adoptada según la Asamblea General de la Asociación Médica Mundial en 1996. Además, el proyecto se realizó de acuerdo con el protocolo y las leyes locales aplicables, así como los requisitos reglamentarios.

Purificación de plaquetas

El protocolo empleado para el aislamiento de plaquetas humanas se basa en el descrito por Abcam[®] (Cambridge, Reino Unido) con algunas modificaciones, que serán detalladas a continuación.

Se extraen dos muestras de sangre de 9 mL de cada participante por punción venosa (BD-Vacutainer[®] con 18.0 mg K₂-EDTA: Plymouth, Reino Unido), manteniendo en balanceo suave hasta llevar a centrifuga a 200 xg por 20 minutos, con frenado por inercia y temperatura ambiente (RT), que se mantendrán durante todo el proceso de aislamiento. Se obtienen tres fases diferenciables, (i) de hematíes, (ii) de células de la serie blanca y (iii) un plasma rico en plaquetas (PRP). Se transfieren dos terceras partes del plasma enriquecido a un tubo estéril de polipropileno de 15 mL (JetBiofil[®], Guangdong, China) con una pipeta Pasteur plástica. Se incorpora la solución HEP buffer en relación de volumen 1:1 suplementada con prostaglandina E₁ (a

concentración final 1 μM). Tras una segunda centrifugación a 100 xg por 15 minutos, se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 15 mL, centrifugando por tercera vez a 800 xg por 20 minutos. Se descarta el sobrenadante, quedando un pellet de plaquetas viables, que es lavado dos veces con 1 mL de solución buffer Citrato sin levantar el pellet. Finalmente, se resuspenden las plaquetas con suavidad en 5 mL de medio SSP++.

Se determinó la concentración plaquetaria por medio de una recta de turbidimetría (en espectrofotómetro con luz de absorción a 600 nm con una dilución 1:9 de la muestra con medio SSP++). Se ajusta la densidad de la suspensión final a 10^5 plaquetas (Plt)/ μL .

Las suspensiones plaquetarias son mantenidas en tubos biorreactores (TubeSpin, TPP®, Trasadingen, Suiza) a temperatura ambiente en incubador humidificado. Deben permanecer en rotación suave en un ángulo de 30° (Movil-Rod, J.P Selecta, Abrera, Barcelona; España) para mantener la quiescencia de las plaquetas, manteniendo su viabilidad. Las plaquetas se analizan funcionalmente a las 24 h posteriores a la extracción del paciente.

Preparación de muestras

Para los **experimentos de captación** de serotonina (5-HT) se disponen 100 μL /pocillo de soluciones dosis crecientes de 5-HT (0 a 1000 μM , concentración final) en medio SSP+ suplementado con ácido ascórbico (100 μM , concentración final), en placas de 96 pocillos de fondo cónico y superficie hidrófoba (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Se añaden 100 μL /pocillo del cultivo plaquetario (densidad final de 10^7 /pocillo) y se incuban durante 2 h a RT en oscuridad y agitación continua, para evitar la activación o la sedimentación de las células. Tras la incubación se enfrían las placas a 4°C y se centrifuga durante 10 minutos a 3200 xg, manteniendo la cadena de frío en todo el proceso. Se descarta el sobrenadante, lavándose el pellet de plaquetas cuidadosamente con 200 μL de medio SSP+ antes de volver a centrifugar por 5 minutos a 3200 xg. Seguidamente se resuspenden los pellet de muestras en 50 μL de H_2O desionizada y se añaden 175 μL de solución HPLC1 a los pocillos, congelando las placas a -80°C 24-48h.

En los **experimentos de captación inespecífica**, las células son incubadas previamente durante 30 minutos en medio SSP+ suplementado con ácido ascórbico y

los diversos fármacos (concentraciones finales: bafilomicina A1 100 nM, reserpina 1-10 μ M, tetrabenazina 10 μ M). La bafilomicina es un inhibidor reversible de la ATPasa de protones vesicular, mientras que reserpina y tetrabenazina son inhibidores de VMAT, siendo esta última específica y reversible de VMAT2. Tras este tiempo se añaden las soluciones dosis crecientes de 5-HT, continuando el protocolo de igual forma que el descrito en los experimentos de captación.

Para los **experimentos de liberación** se disponen plaquetas en una densidad de $2 \cdot 10^7$ /pocillo y se centrifuga a 800 xg durante 20 minutos a T amb y frenado por inercia. Una vez descartado el sobrenadante, las células son resuspendidas lentamente en 100 μ L de trombina (0-4 U/mL) y medio SSP+ suplementado con ácido ascórbico (1 μ M concentración final) e incubadas 90 s en oscuridad. Se enfrían las placas a 4°C y se centrifuga durante 10 minutos a 3200 xg, manteniendo la cadena de frío en todo el proceso. Posteriormente, se toman 80 μ L de sobrenadante y se transfiere a una nueva placa con 5 μ L de solución HPLC2. Se vuelve a centrifugar los pellets durante 5 minutos a 3200 xg y se prosigue el protocolo descrito para captación a partir de este punto, finalizando con la congelación a -80°C.

En el día de los ensayos, las placas se descongelaron y centrifugaron a 3200 xg durante 10 min. Posteriormente, se usaron 150 μ L (85 μ L en el caso de los experimentos de liberación de sobrenadante) del sobrenadante para el análisis de serotonina y el pellet se usó para la cuantificación de proteínas.

Cuantificación de proteínas

Los sedimentos de proteína se resuspendieron en 35 μ L de solución SDS, tomando 25 μ L de las muestras para el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) de la proteína, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, Catálogo BCA#1) y usando albúmina bovina (BSA) para la calibración.

Análisis de serotonina por UPLC

El análisis se realizó por medio de un UPLC isocrático (Shimadzu LC-40, Kyoto, Japón) acoplado a un detector electroquímico LC-4B a 700 mV (BioAnalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) en relación con un electrodo de referencia. La columna de fase inversa empleada es una C18 (tamaño de partícula de 3 μ m, 5 x 0.3 cm) situada dentro de un horno a 46°C. Se utilizó tampón fosfato a pH 3.5 (ácido

ortofosfórico): H₂NaPO₄ 9.66 g/L, EDTA 3.2 mg/L, metanol (8-12%) como fase móvil, previamente filtrada a través de un poro de 0.22 µm y se desgasificó con helio.

Las muestras (15-25 µL) que contenían isoproterenol (200 nM) como estándar interno se enfriaron a 5°C e inyectaron utilizando un muestreador automático (SIL-40CX3, Shimadzu), registrándose los cromatogramas en un Mac-Mini (ordenador Apple) utilizando una rutina ad-hoc LabView 2011 (National Instruments, Austin, TX, USA).

Para el análisis de datos (**Figura 5**), utilizamos macros a medida para Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Todos estos programas están disponibles gratuitamente bajo petición.

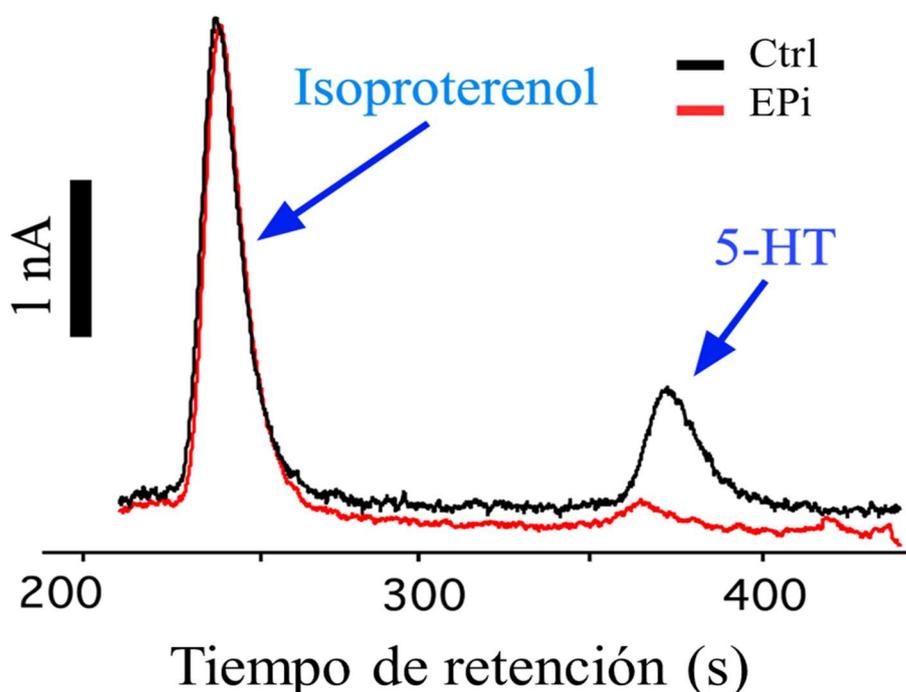


Figura 5 - Cromatogramas obtenidos en UPLC-ED. Cromatogramas típicos de controles (negro) y pacientes con EPI (rojo) para cuantificar la serotonina por HPLC con detección electroquímica usando isoproterenol como estándar interno (200nM). Se expresan en voltaje (nanoamperios, nA) versus tiempo de retención (s).

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 normaliza según la concentración de proteínas.

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

Soluciones empleadas

| | |
|------------------------|---|
| HEPBuffer | NaCl 140.0 mM, KCl 2.7 mM, Na₂-EGTA 5.0 mM, HEPES 3.8 mM, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 μ g/mL, pH 7.4 (NaOH) |
| Buffer Citrato | NaCl 150.0 mM, Na₂-EDTA 1.0 mM, glucosa 50.0 mM, Na⁺-citrato 10.0 mM, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 μ g/mL, pH 7.4 (NaOH) |
| SSP++ | NaCl 69.3 mM, KCl 5.0 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 28.2 mM, Na⁺-citrato 10.8 mM, Na⁺-acetato 32.5 mM, glucosa 5.0 mM, ácido ascórbico 10 μ M, prostaglandina E₁ 1 μ M, penicilina 100 u/mL, gentamicina 40 μ g/mL, pH 7.2 (NaOH) |
| SSP+ | NaCl 69.3 mM, KCl 5.0 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 28.2 mM, Na⁺-citrato 10.8 mM, Na⁺-acetato 32.5 mM, glucosa 5.0 mM, pH 7.2 (NaOH) |
| Solución HPLC 1 | HClO₄ 0.064 M, Na₂-EDTA 386 μ M, L-cisteína 386 μ M, isoproterenol 200 nM |
| Solución HPLC 2 | HClO₄ 0.850 M, Na₂-EDTA 5.1 mM, L-cisteína 5.1 mM, isoproterenol 3.4 μ M |
| Solución SDS | NaOH 0.1 M, dodecil sulfato sódico (SDS) 5 % (m/v) |

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

Deterioro de la captación de serotonina en plaquetas con EP

El análisis comparativo del contenido nativo de serotonina (5-HT) plaquetario en Enfermedad de Parkinson idiopática (EPi) así como la capacidad de captación de este neurotransmisor ha sido realizado con anterioridad (Boullin DJ., 1970; Yamaguchi et al., 1972; Tuomisto J. & Tukiainen E., 1976; Stahl SM., 1977). No obstante dichos estudios se realizaron en escaso número de sujetos y son actual objeto de debate. En nuestro caso, se analizaron tanto las diferencias en contenido nativo y captación con incubación exógena de 5-HT, comparando entre pacientes con EPi, participantes clínicamente sanos (Ctrl) y otros síndromes parkinsonianos (OSP).

La incubación de plaquetas de voluntarios a dosis crecientes de 5-HT (**Figura 6**) presentó un comportamiento sigmoideal, llegando a una meseta en el rango de concentración de 5-HT de 3 a 33 μM para todos los grupos de estudio. Se observó un menor contenido nativo de 5-HT, así como una disminución en la captación total en pacientes con EPi con respecto a los OSP y los Ctrl, siendo estadísticamente significativo en este último (**Figura 6; Figura suplementaria 1, panel menor**). A partir de concentraciones superiores a 33 μM no se observó un modelo sigmoideal, aumentando drásticamente la captación total de 5-HT. Además, en este rango de concentraciones de 5-HT (100 μM – 1mM) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (**Figura suplementaria 1**).

Expresando los valores individuales de contenido nativo y captación total a dosis de 5-HT 10 μM (considerado el valor medio de la meseta) se observaron decrementos significativos de ambos parámetros en pacientes con EPi con respecto a OSP y Ctrl, siendo más acusado con este último (**Figura 7**). Se puede, de igual forma, apreciar que no existen diferencias significativas en estos parámetros entre los grupos Ctrl y OSP. Los valores medios de contenido nativo de 5-HT obtenidos, expresados en nmol/mg proteína, para cada grupo fueron los siguientes (media \pm error estándar, SEM): Ctrl, 3.10 ± 0.12 ; EPi, 1.39 ± 0.13 ; OSP, 2.67 ± 0.25 . Así mismo en captación total se obtuvieron los siguientes valores (media \pm error estándar, SEM): Ctrl, 11.70 ± 0.33 ; EPi, 7.15 ± 0.29 ; OSP, 10.94 ± 1.08 .

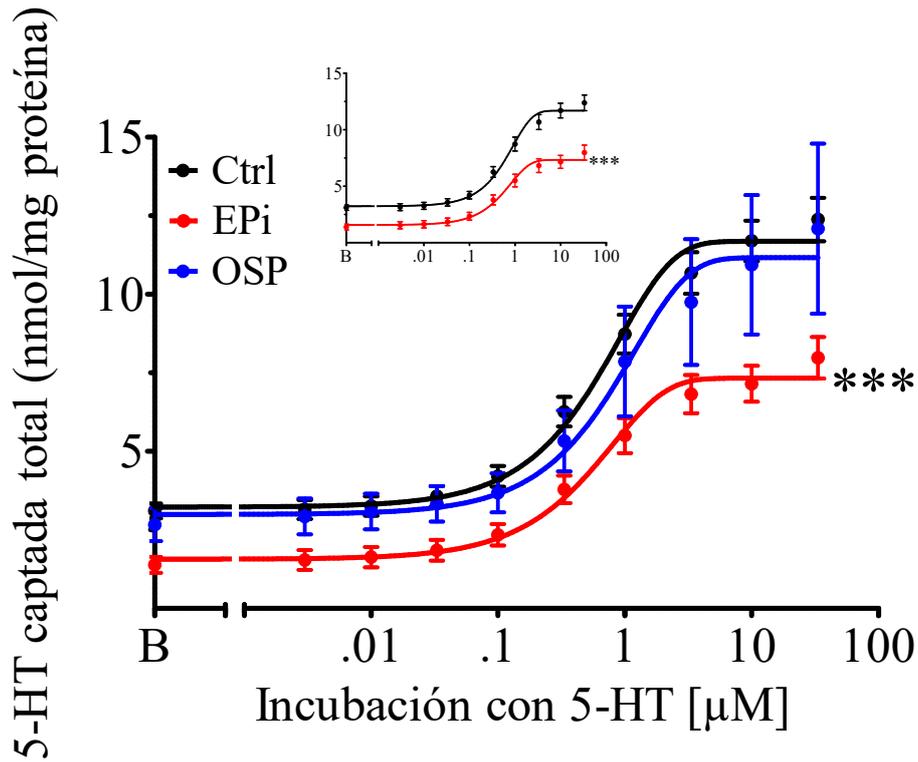


Figura 6 - Contenido nativo y curvas de captación de 5-HT exógena en plaquetas humanas. Las plaquetas de los voluntarios se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la 5-HT descrito en Material y Métodos. Panel mayor: Se muestran las curvas predictivas y datos (medias \pm intervalos confianza 95%) de captación total en los grupos voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; negro, n = 71), pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo, n = 64) y sujetos con otros síndromes parkinsonianos (OSP; azul, n = 25). Panel menor: Gráfica comparativa entre Ctrl y EPI. ***, p<0.001 (ANOVA).

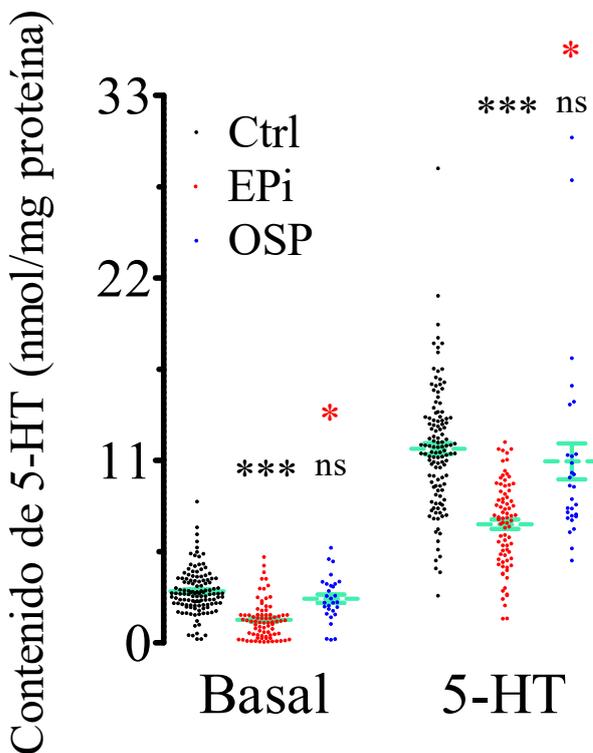


Figura 7 – Datos agrupados de contenido nativo y captación de 5-HT en plaquetas humanas. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Se muestran los datos medios de duplicados individuales de contenido nativo (Basal) y la captación (5-HT) tras la incubación de 2 h con 5-HT (10 μ M), para cada grupo de estudio: voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; negro, n = 123), pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo, n = 80) y sujetos con otros síndromes parkinsonianos (OSP; azul, n = 29). Las líneas discontinuas verdes horizontales indican la media y horizontales continuas los errores estándar. ***, p<0.001; *, p<0.05; ns, no significativo (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPI) (Mann–Whitney’s test).

Determinación de la captación intrínseca vesicular

La manipulación de la 5-HT en el laboratorio no es sencilla, ya que es altamente lipofílica y tiende a unirse a membranas celulares. En plaquetas, este neurotransmisor es almacenado a muy altas concentraciones en vesículas secretoras (VS) aunque solo hay de 3 a 8 por plaqueta. Teniendo estas células una gran proporción de membrana a volumen, particularmente debido a su pequeño tamaño, irregular forma y la presencia de un sistema tubular, la importancia relativa de la captación no específica de la 5-HT debe ser evaluada. Este parámetro se puede estimar indirectamente usando fármacos que bloquean la actividad de los transportadores de VS: bafilomicina A1 que bloquea reversiblemente la V-ATPasa; y reserpina o tetrabenazina que, de forma irreversible y reversible respectivamente, bloquean VMAT2.

En todos los grupos de estudio, la reserpina y tetrabenazina tuvieron un efecto similar sobre la captación total de 5-HT, mientras que la bafilomicina tuvo un efecto ligeramente menos potente, si bien en todos los casos el decremento de 5-HT captada fue significativo (**Figura 8A**). Restando el contenido nativo de 5-HT cada uno de los grupos se obtiene una componente resistente a los inhibidores VMAT2. Dicha componente, además, no fue significativamente diferente en pacientes con EPi (2.44 ± 0.28 nmol/mg proteína; media \pm SEM) con respecto a sujetos Ctrl y OSP (2.48 ± 0.28 nmol/mg proteína y 1.87 ± 0.48 nmol/mg proteína respectivamente; media \pm SEM), lo que indica que esto se debe a la unión no específica de 5-HT.

Analizando la capacidad de inhibición de dichos fármacos en cada grupo de estudio (**Figura 8B**) se observó un decremento de la captación total de 5-HT significativamente más marcado en los grupos Ctrl y OSP en comparación con los pacientes de EPi. Este hecho podría ser manifiesto un mayor grado de contribución inespecífica de la 5-HT en EPi ya que, si bien la componente resistente a los inhibidores VMAT2 es similar, la captación es significativamente menor. Estas ratios reflejan el contenido remanente en las plaquetas tras la inhibición de los mecanismos de captación vesicular, poniendo de manifiesto la existencia dicha componente inespecífica. Además, como se ha comentado en el apartado previo, a partir de dosis de 5-HT exógena superiores a $33 \mu\text{M}$ el modelo de captación no es sigmoidal (**Figura suplementaria 1**). Esto indicaría la existencia de esa captación “secundaria y deslocalizada” en la plaqueta que debe ser tenida en cuenta.

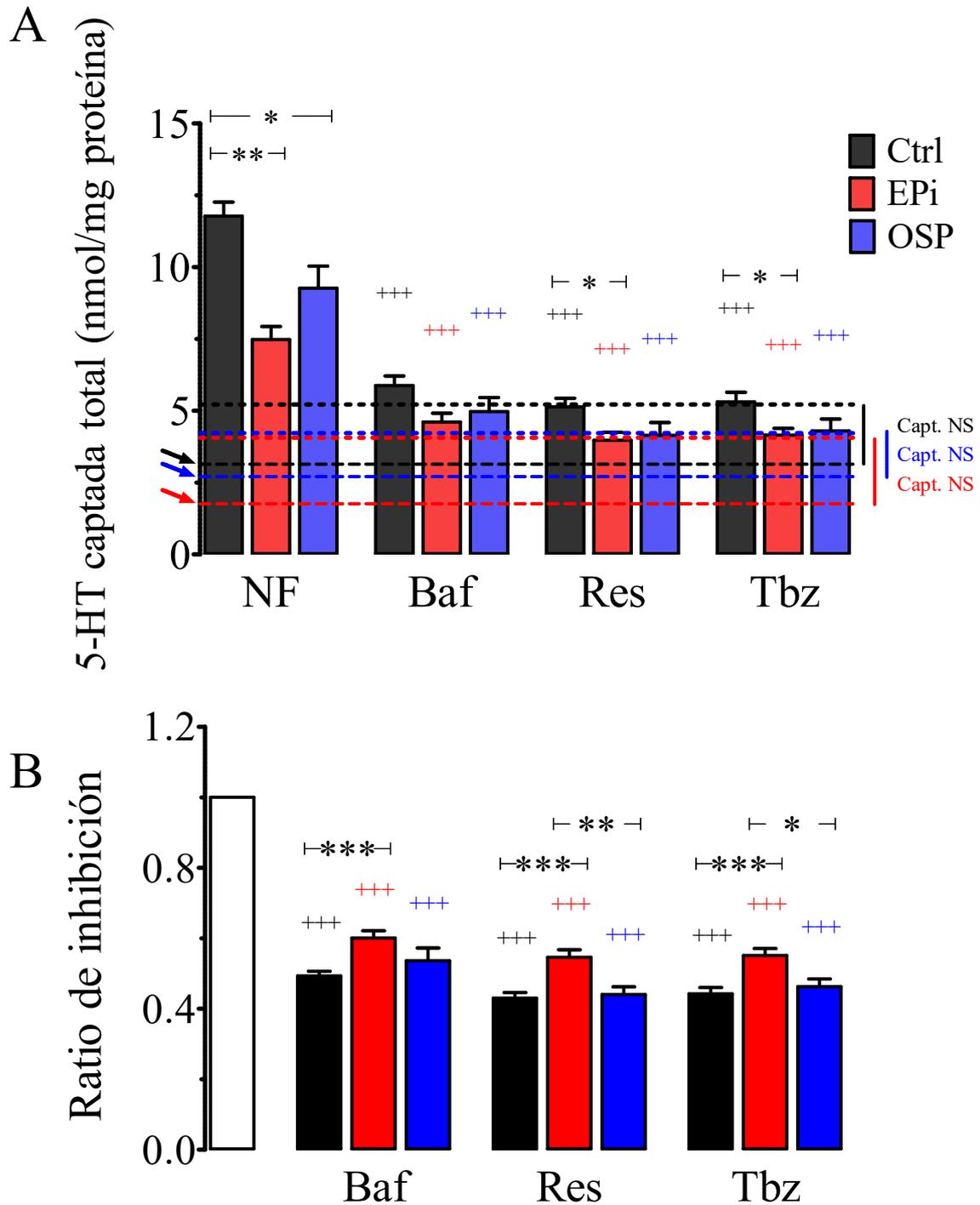


Figura 8 - Captación de serotonina no específica por plaquetas revelada con inhibidores de VMAT y V-ATPasa. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Las plaquetas se incubaron 30 min en ausencia de fármaco (NF), bafilomicina A1 (100 nM, Baf), reserpina (10 μ M, Res) o tetrabenazina (10 μ M, Tbz), seguido de una incubación de 2 h con serotonina (10 μ M). Panel A: El componente fármaco-resistente indica una captación no específica. Las flechas apuntan los niveles nativos de 5-HT (sin serotonina exógena añadida) en voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; línea discontinua negra), pacientes con EPI (EPI; línea discontinua roja) y con otros síndromes parkinsonianos (OSP; línea discontinua azul). La captación no específica (Capt. NS) fue similar en todos los grupos: n = 32 Ctrl, n = 33 EPI y n = 11 OSP. Panel B: La ratio de inhibición se determina dividiendo la captación de cada fármaco entre su total para cada grupo respectivamente. La barra blanca representa la captación relativa de 5-HT en ausencia de fármaco para todos los grupos. Se muestra el nivel de significación dentro de un mismo grupo (+) y entre los grupos (*); ***, p<0.001; **, p<0.01; *, p<0.05 (ANOVA test con corrección Bonferroni).

De cara a la posible herramienta diagnóstica de este estudio, 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. Para calcular la captación específica, estudiamos un grupo de controles, pacientes con EPI y con otros parkinsonismos en presencia y ausencia de reserpina (1 μ M) a dosis crecientes de 5-HT (**Figura 9A**). Seguidamente se cuantificó la captación específica o intrínseca de VS como la diferencia entre el componente resistente a la reserpina y la captación total, sumando la componente de contenido nativo para cada caso (**Figura 9B**).

Similar a lo evaluado en apartados anteriores, en la **Figura 9B** se observó el modelo sigmoide de la captación de 5-HT vesicular tras sustraer la componente inespecífica, encontrando unas diferencias más acusadas a las previamente descritas entre el grupo EPI frente a los OSP y Ctrl, siendo más significativa en este último.

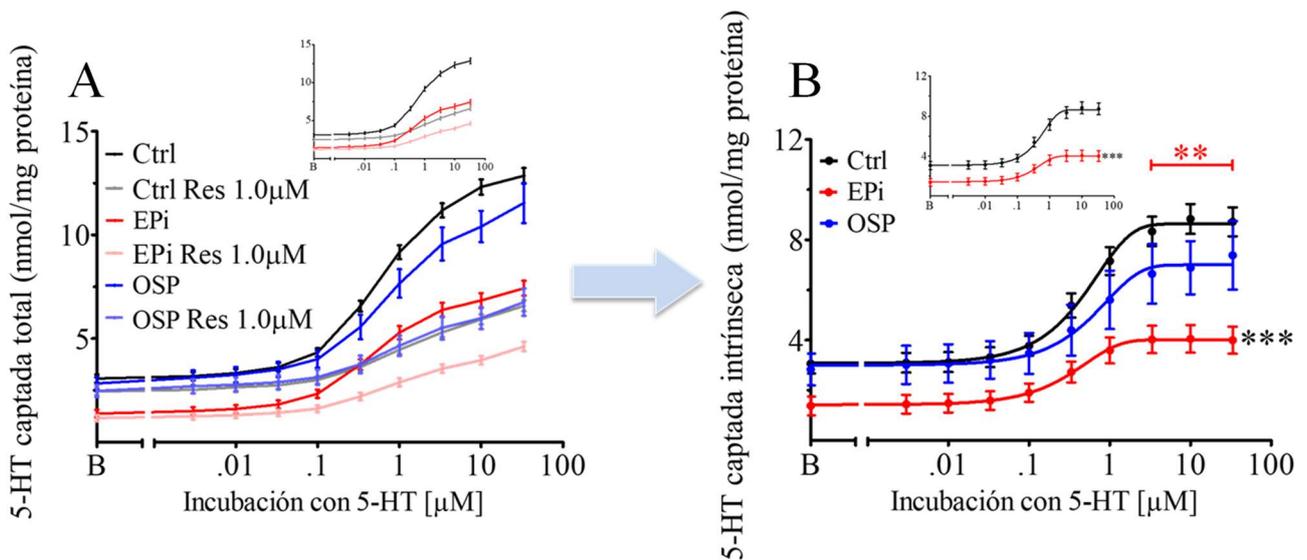


Figura 9 – Valoración de la componente inespecífica de serotonina en plaquetas. Las plaquetas de los voluntarios se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la 5-HT descrito en Material y Métodos. Panel A mayor: Se muestra el trazado y datos (medias \pm SEM) de captación de 5-HT en ausencia y presencia de reserpina 1.0 μ M en voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; negro, n = 47), con enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo, n = 44) y con otros síndromes parkinsonianos (OSP; azul, n = 15). Panel A menor: Trazado comparativo entre Ctrl y EPI. Panel B mayor: Curvas predictivas y datos (medias \pm intervalos confianza 95%) de captación de 5-HT vesicular, excluyendo la componente inespecífica. Panel B menor: Gráfica comparativa entre Ctrl y EPI. ***, p < 0.001; **, p < 0.01 (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPI) (ANOVA).

Valorando ahora la captación intrínseca a dosis de 5-HT 10 μ M se observaron decrementos significativos en pacientes con EPI con respecto a OSP y Ctrl, siendo más acusado en este último, sin existir diferencias significativas entre los grupos Ctrl y OSP (**Figura 10**). Los valores medios de captación intrínseca de 5-HT obtenidos, expresados

en nmol/mg proteína, para cada grupo fueron los siguientes (media \pm error estándar, SEM): Ctrl, 8.83 ± 0.30 ; EPI, 4.05 ± 0.27 ; OSP, 6.89 ± 0.50 . Frente a los valores individuales de la captación total de 5-HT, existe un menor grado de solapamiento entre los grupos de estudio tras la sustracción de la componente inespecífica, lo que refleja la disfuncionalidad de las VS en plaquetas EPI.

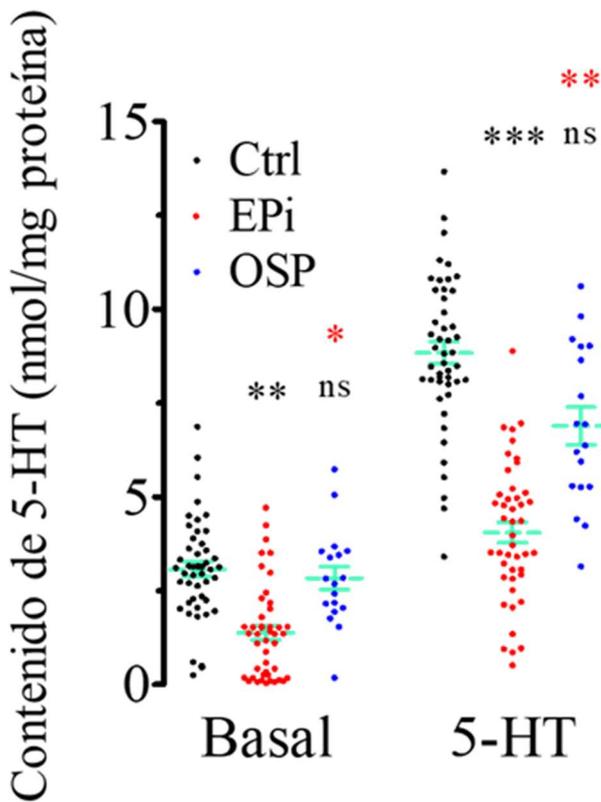


Figura 10 - Existe una menor capacidad de captación específica de 5-HT en plaquetas de pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Se muestran los datos medios de duplicados individuales de contenido nativo (Basal) y la captación intrínseca (5-HT) tras restar el componente no específico: una incubación de 30 min con reserpina ($1 \mu\text{M}$) seguido de una incubación de 2 h con 5-HT ($10 \mu\text{M}$), para cada grupo de estudio: voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; negro, $n = 47$), pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo, $n = 45$) y sujetos con otros síndromes parkinsonianos (OSP; azul, $n = 18$). Las líneas discontinuas verdes horizontales indican la media y horizontales continuas los errores estándar. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; ns, no significativo (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPI) (Mann-Whitney's test).

En base a los resultados obtenidos de contenido nativo, captación total e intrínseca, se han establecido unos valores umbrales 'patológicos' que nos permiten clasificar y diferenciar a los participantes, en relación con sus niveles de captación individuales. Dichos umbrales se definieron arbitrariamente como la diferencia entre la media y la desviación estándar de los valores control, consistentes a lo anteriormente expuesto, existiendo un déficit de 5-HT en los pacientes de EP. Se establece un umbral $1.76 \text{ nmol/mg proteína}$ relativo al contenido nativo, $8.05 \text{ nmol/mg proteína}$ para captación total de 5-HT y $6.81 \text{ nmol/mg proteína}$ para la específica.

Valoración de casos subclínicos y 'outliers'

Uno de los objetivos establecidos para el proyecto es explorar la posibilidad de detectar casos de EPI en estados subclínicos. Tomando como base los umbrales establecidos, se realiza una valoración individual de cada participante. Esto permite valorar tanto a bondad de los umbrales como la sensibilidad de la prueba. En el transcurso del proyecto se han detectado participantes que presentan uno o varios niveles de serotonina anómalos para su grupo de estudio, siendo necesario un estudio más exhaustivo de éstos. Para la valorización de estos participantes se ha realizado un análisis de trazabilidad de los datos obtenidos por cada individuo.

No todos los voluntarios clínicamente sanos que participaron en el estudio se ajustan a los umbrales determinados previamente. En primer lugar, existen 7 participantes cuyo contenido nativo de 5-HT en plaquetas no supera el umbral, pero presentando unas captaciones total y específica acordes a su grupo (**Figura 11A**, negro; **Tabla S1**).

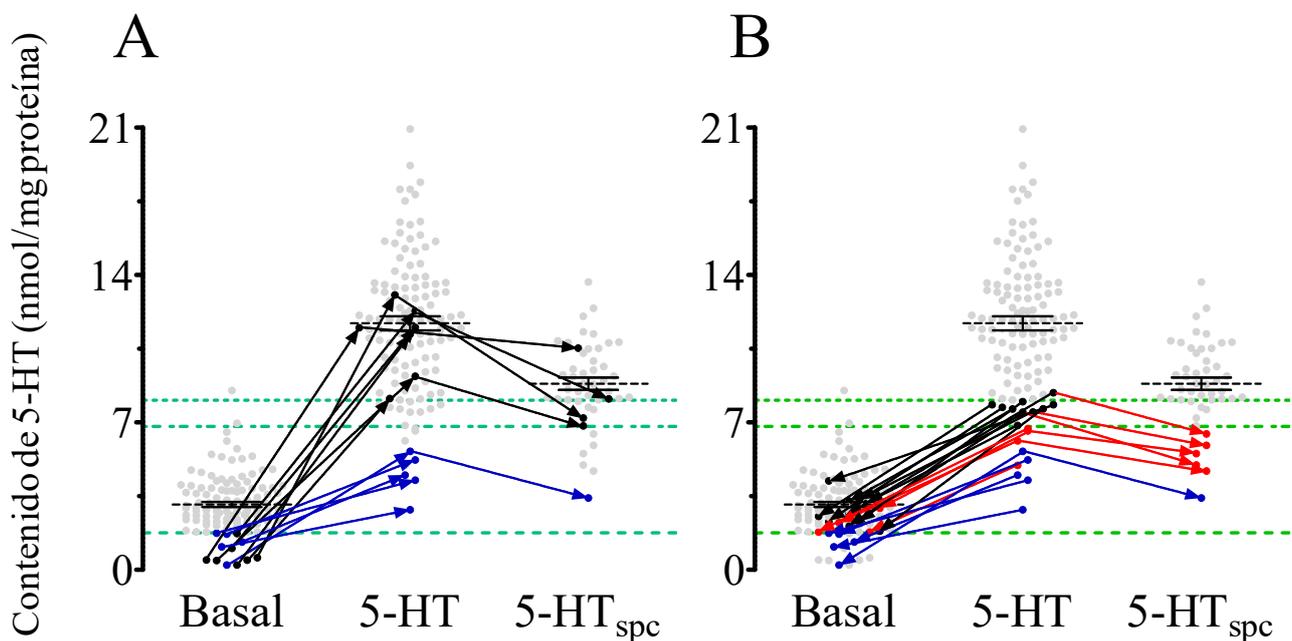


Figura 11 – Estudio de trazabilidad de voluntarios clínicamente sanos (Ctrl) con contenidos y/o captaciones alteradas. Los datos agrupados ($n = 123$) representan el promedio de los duplicados (gris puntos), donde las líneas negras horizontales discontinuas muestran los medios y el sólido líneas negras horizontales los errores estándar. Las líneas discontinuas verdes representan los umbrales 'patológicos' de los parámetros establecidos para este estudio. Se muestran los niveles de contenido nativo (Basal), captación total (5-HT) e intrínseca de serotonina (5-HT_{spc}) respectivamente. Los valores atípicos de la Tabla S1 se muestran como: **A**) puntos y flechas negras para contenido nativo alterado y captaciones total y específica supraumbrales. **B**) puntos y flechas negras para contenido nativo normal y captación total alterada, y puntos y flechas rojas cuando la captación total o intrínseca está debajo del umbral específico. Los puntos y flechas azules representan en ambos paneles sujetos con contenido nativo y captaciones total y, posiblemente, intrínseca alterados.

También, se han encontrado 5 voluntarios con unos perfiles acordes a los del grupo de pacientes de EPi (**Figura 11A-B**, azul; **Tabla S1**). Estos pacientes presentan tanto un contenido nativo como unas captaciones totales y basales subumbrales, siendo de interés su seguimiento.

Los criterios umbral previamente descritos sirvieron para decidir el nivel prioridad de seguimiento a aquellos voluntarios que ya habían participado en el estudio en el periodo comprendido entre 2019-2021. 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.

No todos los pacientes clínicamente diagnosticados de EPi presentaron valores subumbrales en los parámetros descritos con anterioridad (**Tabla S2**), si bien a parte de estos ‘*outliers*’ se pueden explicar atendiendo a cuales parámetros se consideran ‘patológicos’. En primer lugar, existen 10 pacientes con contenido nativo de 5-HT alterado y captación total normal, de los cuales 7 reflejaron una alteración en la captación intrínseca, la propia de las VS. Juntos a estos, 4 pacientes presentaron captaciones total e intrínseca alterados y 5 adicionales solo una gran alteración en este último parámetro. Todos ellos presentarían disfuncionalidad en sus VS plaquetarias que impediría la correcta compartimentalización de la 5-HT y, por tanto, posiblemente de la dopamina en neuronas dopaminérgicas. Este hecho pone de manifiesto la importancia del parámetro de captación intrínseca. Al igual que con los posibles casos subclínicos, se ha establecido una prioridad de seguimiento según el número y tipo de parámetro para un estudio más exhaustivo de estos pacientes.

Valoración de parkinsonismos secundarios y diagnóstico diferencial

Debido a las diferencias encontradas entre los grupos EPi y OSP, ha sido necesario distinguirlos en el análisis de los datos. Sin embargo, dada la gran variedad de síndromes parkinsonianos (iatrogénico, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva...), no es de extrañar que se encuentre una elevada heterogeneidad de los datos, visible en las desviaciones estándar graficadas en las figuras previas. Para ello, se ha tenido en cuenta la valoración diferencial de cada uno de los parkinsonismos en su contenido nativo de 5-HT (**Figura 12**), como su captación total e intrínseca (**Figura 13**).

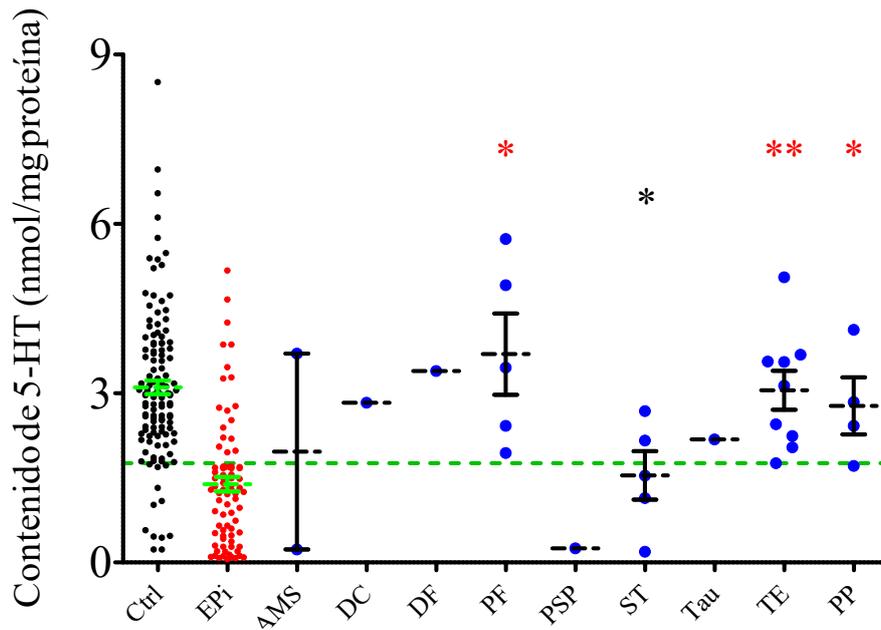


Figura 12 – Contenido nativo de 5-HT en plaquetas de pacientes con distintos síndromes parkinsonianos. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Evaluación del contenido nativo de 5-HT en los distintos síndromes parkinsonianos recogidos frente a los grupos de estudio clínicamente sanos (Ctrl; negro; n = 123), pacientes de Enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo; n = 80). Las líneas discontinuas verdes representan los umbrales ‘patológicos’ de los parámetros establecidos para este estudio. Las líneas discontinuas verdes claras horizontales indican la media y horizontales continuas los errores estándar para Ctrl y EPI, y las negras para los parkinsonismos. AMS: Atrofia multisistémica, DC: Demencia de cuerpos de Lewy, DF: Distrofia Focal, PF: Parkinsonismo farmacológico, PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva, ST: Síndrome Tremórico; Tau: Taupatía, TE: Temblor Esencial, PP: Otros Parkinson Plus. **, p<0.01; *, p<0.05 (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPI) (Mann–Whitney’s test).

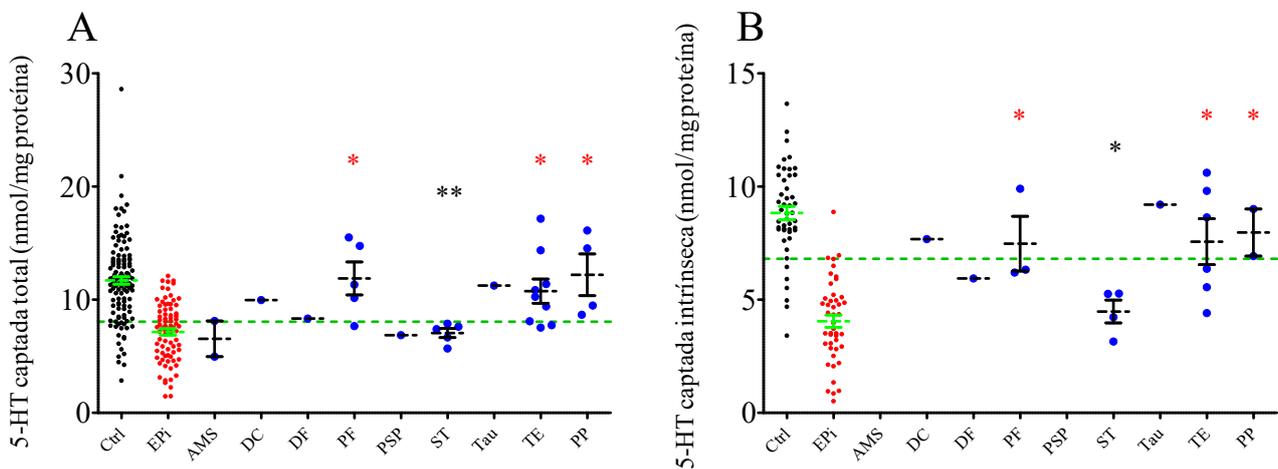


Figura 13 – Captación total e intrínseca de 5-HT en plaquetas de pacientes con distintos síndromes parkinsonianos. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Evaluación de la captación total (A) e intrínseca (B) de 5-HT en los distintos síndromes parkinsonianos recogidos frente a los grupos de estudio clínicamente sanos (Ctrl; negro; n = 123, 47 en intrínseca), pacientes de Enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo; n = 80, 45 en intrínseca). Las líneas discontinuas verdes representan los umbrales ‘patológicos’ de los parámetros establecidos para este estudio. Las líneas discontinuas verdes claras horizontales indican la media y horizontales continuas los errores estándar para Ctrl y EPI, y las negras para los parkinsonismos. AMS: Atrofia multisistémica, DC: Demencia de cuerpos de Lewy, DF: Distrofia Focal, PF: Parkinsonismo farmacológico, PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva, ST: Síndrome Tremórico; Tau: Taupatía, TE: Temblor Esencial, PP: Otros Parkinson Plus. **, p<0.01; *, p<0.05 (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPI) (Mann–Whitney’s test).

Dentro de los datos obtenidos se encuentran parkinsonismos con niveles nativos de 5-HT propios a los encontrados en EPi, como la Parálisis Supranuclear Progresiva o el síndrome tremórico, y otros semejantes a los vistos en Ctrl, como el temblor esencial, o los parkinsonismos iatrogénicos, que presentan diferencias significativas con el EPi. Esta heterogeneidad se mantiene constante en el estudio de los niveles de captación total e intrínseca de 5-HT. Es de interés recalcar el escaso número de participantes recogidos para este estudio, encontrando una representatividad que se aleja mucho de ser óptima, por lo que estos resultados deben ser tomados como meramente orientativos, necesitando un estudio más exhaustivo.

Mecanismos de liberación de serotonina

Como se ha mencionado con anterioridad, una disfunción en las VS conllevaría no solo a una menor acumulación de aminas biógenas sino también al aumento en la descompartimentalización de estas por la célula, desembocando en fenómenos de difusión pasiva. La capacidad de liberación de 5-HT plaquetaria fue valorada en cada uno de los grupos de voluntarios por tratamiento con trombina 4 U/mL, comparando los resultados obtenidos con los niveles de difusión pasiva de 5-HT.

Dicha liberación se evaluó considerando el contenido de 5-HT en el pellet de plaquetas frente al existente en el sobrenadante tras el tratamiento (**Figura 14A**). En presencia de secretagogo, los pacientes EPi presentaron unos niveles 5-HT liberada significativamente menores con respecto a Ctrl y OSP. Valorando la difusión pasiva en ausencia de estímulo no encontramos diferencias significativas entre los niveles de 5-HT, mientras que el contenido remanente en las células se corresponde al previamente descrito para contenido nativo de 5-HT.

Atendiendo a los ratios de liberación (**Figura 14B**), las plaquetas de pacientes con EPi secretaron significativamente menos 5-HT (~ 60%) con respecto a las plaquetas de controles (~ 71%). Por su parte se observó un aumento en la difusión pasiva de 5-HT en EPi frente a Ctrl y OSP, indicativo de que en VS de pacientes con EPi los mecanismos para retener las aminas biógenas almacenadas también se ven afectados.

Curiosamente, si bien la difusión pasiva de 5-HT en OSP no se mostró alterada con respecto a los controles, en este heterogéneo grupo se observó una menor secreción estimulada de este neurotransmisor.

La explicación a este hecho no está clara, aunque se podría argumentar que existen defectos en los mecanismos de exocitosis, fuera aparte de no existir una propia disfunción en sus VS.

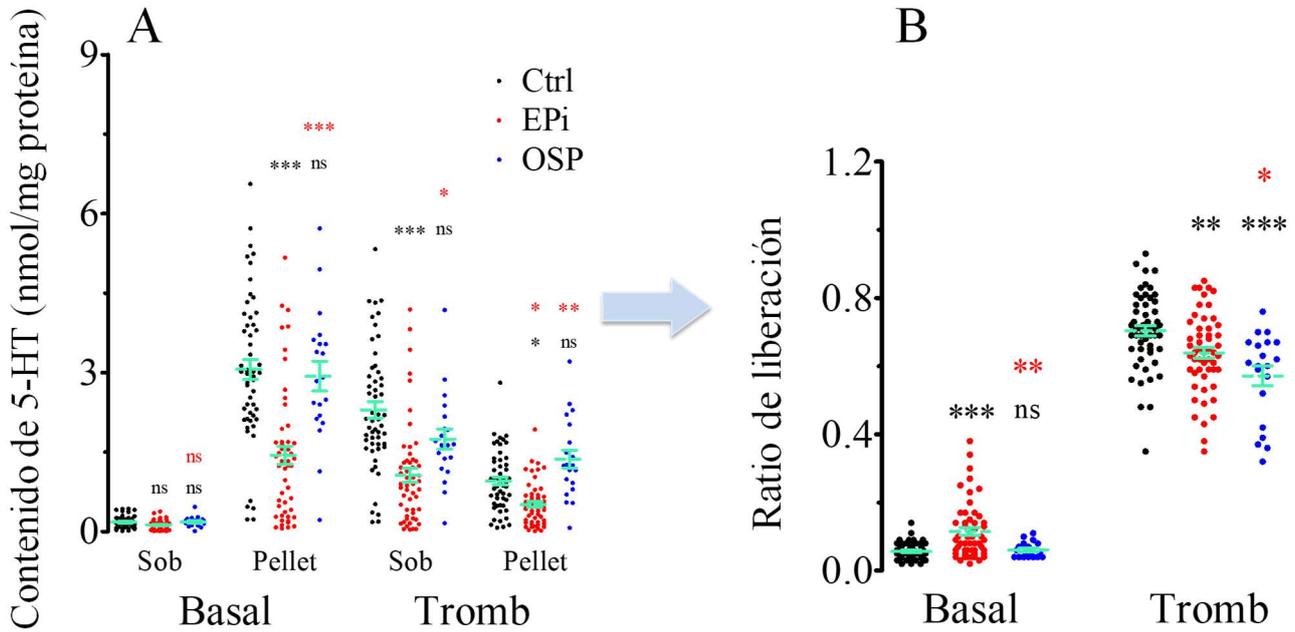


Figura 14 - Los mecanismos secretorios están alterados en las plaquetas de los pacientes con EP. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Se muestran los datos medios de duplicados individuales, donde las líneas discontinuas verdes claras horizontales indican la media y horizontales continuas los errores estándar para cada grupo y condición. Panel A: La serotonina se cuantificó en el sobrenadante (Sob) y el sedimento de plaquetas se recuperó mediante centrifugación (Pellet = serotonina no secretada). Se estimularon plaquetas de individuos sanos (Ctrl) y de pacientes con EPi (EPi) y otros síndromes parkinsonianos (OSP) durante 90 s con trombina (4 U/mL). Panel B: La ratio de liberación (= liberación de serotonina/(serotonina liberada + serotonina restante)) indicó que hubo más fuga de 5-HT de las plaquetas EPi pero menos liberación evocada por trombina, mientras que el grupo OSP, que presentó diferencias significativas en la fuga de serotonina, obtuvo una liberación activa menor a las de EPi (Control, n = 54; EPi, n = 53; OSP, n = 20). ***, p<0.001; **, p<0.01; *, p<0.05; ns, no significativo (negro, comparación con Ctrl; rojo comparación con EPi) (Panel A, ANOVA; Panel B, prueba t de Student para datos no apareados).

DISCUSIÓN

Se ha propuesto la citotoxicidad inducida por el aumento de la concentración de dopamina (DA) citosólica como causa de la neurodegeneración en las neuronas dopaminérgicas nigrostriatales. Teniendo en cuenta que las vesículas de secreción (VS) constituyen el principal reservorio de aminas tanto en neuronas como en plaquetas, siendo el mecanismo básico de acumulación de estos compuestos, en este estudio se ha cuantificado y caracterizado diferentes perfiles de captación, acumulación y liberación de serotonina (5-HT) en plaquetas de pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, esta no es la primera vez en la que se relacionan las plaquetas a la EP. Hace algunos años se informó una disminución de la 5-HT basal junto con una absorción normal (Boullin DJ., 1970) y se observó una capacidad reducida para la absorción de DA por parte de las VS en las plaquetas de la enfermedad de Parkinson no tratada, aunque estos valores aparentemente vuelven a la normalidad después del tratamiento con L-DOPA. Aunque otras aminas como la noradrenalina (NA) y la 5-HT también pueden convertirse en especies nocivas, la DA y su metabolito, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAL), son especialmente neurotóxicos debido a la generación de ROS (Eisenhofer GK., 2004; Goldstein DS., 2014) y la capacidad de la DOPAL para inducir también la agregación del α -sinucleína (Goldstein et al., 2013). La principal forma fisiológica de superar estos cambios metabólicos es confinar rápidamente la DA en las VS, donde está protegida de la degradación y, por lo tanto, los defectos funcionales en las VS pueden producir un exceso de DA citosólica. Los VS también representan un reservorio importante de Ca^{2+} (Camacho et al., 2008), y la combinación de DA y Ca^{2+} citosólicos altos puede actuar sinérgicamente para promover la neurotoxicidad (Moscharov et al., 2009). Además, la acumulación disfuncional de NA y 5-HT en las VS podría explicar los síntomas no motores de la EP, como trastornos del sueño, depresión mayor, trastornos digestivos, así como signos periféricos como hipotensión ortostática y bradicardia.

Al inicio de este estudio se contemplaba la comparación entre dos grupos principales de estudio, pacientes con EPi y controles; sin embargo, en el análisis de los datos fue necesario contemplar un grupo más, los parkinsonismos. 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 paratiroideas) y al de enfermedades causadas por priones (fundamentalmente la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). De todos ellos, los inducidos por fármacos o tóxicos son los más frecuentes, destacando los neurolépticos, bloqueadores de la entrada de calcio, antiepilépticos y pesticidas entre otros (Sociedad Española de Neurología, 2019).

Deterioro de la captación de serotonina en plaquetas

Se han observado un contenido nativo de 5-HT significativamente menor y sobretodo alteración en la capacidad de captación de este neurotransmisor en plaquetas de pacientes con EP idiopático (EPi) frente al grupo con otros síndromes parkinsonianos (OSP) y al grupo clínicamente sano (Ctrl), siendo más notorio para este último. Esta diferenciada captación podría atribuirse inicialmente a una disminución en la secreción de 5-HT en plasma por parte de las células enterocromafines. Sin embargo, este hecho queda descartado al observarse que dicho déficit de captación es consistente tras tratarse e incubarse plaquetas con distintas concentraciones de 5-HT exógena, indicando una disfunción en los mecanismos vesiculares de captación y acumulación en pacientes de EP frente a control en condiciones constitutivas (**Figuras 6 y 7**). Este hecho indica que el parámetro de contenido nativo de 5-HT plaquetaria es condición necesaria pero no suficiente para correlacionar la valoración clínica de la EPi y que se debe tener en cuenta la disfuncionalidad de las VS en el manejo de la 5-HT. Se ha observado un aumento drástico en la captación de 5-HT a elevadas dosis de este neurotransmisor (por encima de 100 μ M). Como se comentó previamente, este aumento fue similar para todos los grupos de estudio, indicando la existencia de una componente inespecífica en la captación de 5-HT (**Figura suplementaria 1**). Esta componente debe ser tomada en cuenta, ya que no toda la 5-HT es acumulada en las VS, quedando parcialmente almacenados en otros compartimentos celulares, principalmente el citosol.

Determinación de la captación intrínseca vesicular

A la luz de los resultados obtenidos se ha encontrado una disfunción muy acusada en los mecanismos de captación específica o intrínseca de 5-HT en las VS plaquetarias de pacientes con EPi frente a los establecidos por el grupo de pacientes clínicamente sanos y la mayoría de otros síndromes parkinsonianos (**Figuras 9 y 10**). Esta disfunción vesicular se ve compensada en la captación total por un aumento en la

acumulación deslocalizada, indicando un significativo aumento de la descompartimentalización de aminas biógenas en los pacientes con EPi. Este incremento de 5-HT citosólica en plaquetas de pacientes EPi refleja lo planteado en la hipótesis, por lo que las plaquetas humanas son un modelo plausible de estudio de los mecanismos de captación de DA en las neuronas DAérgicas nigrostriatales implicadas en la EP. Los resultados obtenidos han permitido, por tanto, la posibilidad de establecer unos criterios preclínicos basados en los parámetros de contenido nativo de 5-HT plaquetaria así como de capacidad de captación total e intrínseca, con valores umbrales ‘patológicos’ de estos parámetros para clasificar y diferenciar satisfactoriamente a los participantes del estudio. Este hecho sugiere el potencial uso del ahora denominado ‘test de serotonina’ para un futuro diagnóstico preclínico de la EPi.

Diagnóstico preclínico y ‘outliers’

Uno de los objetivos establecidos para el proyecto fue explorar la posibilidad de detectar casos de EPi en estados subclínicos, antes de la aparición de síntomas motores, a través de los umbrales establecidos para la valoración individual de cada participante.

Se han encontrado pacientes cuyo contenido nativo de 5-HT se encuentra alterado, sin afectar a los sistemas de captación. En ellos se presume una disminución en la secreción de este neurotransmisor en el organismo, no estando alterados los mecanismos de captación vesicular de 5-HT plaquetaria. La disminución en la secreción en plasma de 5-HT se ha descrito como marcador de depresión endógena y, a su vez, esta enfermedad como un síntoma no motor de la EPi, siendo de interés realizar un seguimiento a estos voluntarios. Concretamente 4 pacientes (213J, 553T, 540P y 895B) fueron considerados inicialmente como posibles casos de EPi y posteriormente diagnosticados con depresión, consistentes con los datos de captación de 5-HT normal a pesar de que los niveles basales fueron bajos (**Tabla S1**).

Así mismo, algunos voluntarios clínicamente sanos han presentado tanto un contenido nativo de 5-HT como unas captaciones totales y/o basales subumbrales, siendo de interés su seguimiento, pudiendo atribuirse a priori una detección preclínica de EPi. Parte de estos voluntarios fueron reconvocados y revalorados, obteniéndose unos resultados similares. En un caso concreto (277R) con un DaTSCAN que presentaba ligera hipocaptación asimétrica. Sin embargo, es necesario un estudio más

exhaustivo y pormenorizado para delimitar la sensibilidad y bondad del ‘test de serotonina’ en el ámbito diagnóstico.

Por otra parte, de todos los pacientes de EPi con valores ‘atípicos’ en los parámetros establecidos hubo un 8% que pueden reflejar diversas formas de EP que no implica defectos VS, o bien estas diferencias se debieron al estado de las plaquetas en el momento de la sangre donación, diagnóstico erróneo u otras razones que actualmente están siendo examinadas (**Tabla S2**). Es necesario anotar que existen enfermedades concomitantes que pueden afectar al estudio, ya sea porque interfiere en los protocolos de aislamiento, como en los estudios realizados en las plaquetas a posteriori. La trombocitopenia induce una sobreestimación del contenido en 5-HT, el hipertiroidismo afecta al contenido proteico plaquetario, y la dislipemias aumentan la captación extrínseca de 5-HT.

Estos análisis, si bien son nuevos, debiendo ser refinados para minimizar los errores inducidos por la propia manipulación humana de las muestras como la intrínseca aportada por las técnicas y el instrumental. Entre las posibilidades a futuro de mejora de estos estudios se considera la cuantificación de 5-HT en base al volumen total de plaquetas estudiadas, en vez de la cuantificación por miligramo de proteína, que es lo realizado en el presente proyecto. En este sentido existen estudios que aluden cambios morfológicos en plaquetas de EPi como aumento de tamaño, que guardarían sentido con un aumento de la captación inespecífica de 5-HT ya evaluada (Factor et al., 1994; Koçer et al., 2013; Pei Y. & Maitta RW., 2019).

Valoración de parkinsonismos secundarios y diagnóstico diferencial

Si bien los parkinsonismos parecen presentar un perfil intermedio entre los pacientes de EP y los controles, es necesario anotar que el número de casos aquí estudiados no es el óptimo, de forma que los resultados referentes a este grupo son orientativos. Así mismo, es importante aclarar que las patologías englobadas como parkinsonismos pueden ser cursadas con una EP propiamente dicha, de forma que los resultados de este grupo de estudio pueden ser heterogéneos, además de la variabilidad propia de cada una de las patologías parkinsonianas. Se necesita más estudio para aclarar los perfiles de los parkinsonismos, sin embargo, la diferenciación orientativa de este grupo puede dar una mayor base al poder diagnóstico que se propone en este proyecto, pudiendo discernir entre cuadros clínicos similares.

Mecanismos de liberación de serotonina

Las plaquetas liberan 5-HT por exocitosis cuando se incuban con un secretagogo fisiológico como la trombina. Esta respuesta secretora suele durar menos de 20 s pudiendo, por tanto, caracterizarse la liberación de este neurotransmisor. Estos datos permiten dilucidar los niveles de 5-HT liberada de forma activa así como la difusión pasiva de este neurotransmisor sin el estímulo secretagogo (**Figura 14**). Como se esperaba desde el planteamiento de la hipótesis, se observó un aumento significativo en los niveles de difusión pasiva de 5-HT en el grupo de pacientes con EPi en relación con los grupos control y de parkinsonismos. Así mismo, y de manera consecuente, el estímulo con trombina refleja una ligera disminución en la liberación de 5-HT en pacientes con EPi. Este hecho está en consonancia como consecuencia del incremento de descompartmentalización y al propio déficit de contenido vesicular de 5-HT en las plaquetas de pacientes con EPi.

Frente a esto, encontramos que el grupo constituido por los pacientes de parkinsonismo también presenta menores niveles de liberación. Sin embargo, esta disminución no es consecuencia de niveles alterados de 5-HT vesicular, atribuyéndose, entonces, a una disfunción en los mecanismos propios de la liberación activa vesicular. Esto podría permitir un nuevo punto de apoyo para el diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Parkinson idiopática frente a los parkinsonismos.

Reflexiones finales

No está claro si estos hallazgos explican el origen de la enfermedad o si son una mera consecuencia de la EP, pero respaldan lo primero, ya que parece poco probable que la alteración de la captación de 5-HT por parte de las plaquetas sea el resultado de la evolución de la EP. La neurodegeneración asociada a la EP se presenta en las décadas previas al inicio de los primeros síntomas, pero aún no existen herramientas diagnósticas capaces de detectar de forma fiable la enfermedad en estas fases subclínicas prolongadas. Aunque se han propuesto varios biomarcadores para el diagnóstico precoz de esta enfermedad, entre los que se encuentran la α -sinucleína (Devine et al., 2011), o la DJ-1 deglicasa o la actividad de la β -glucocerebrosidasa en el líquido cefalorraquídeo (Shi et al., 2011), su costo, incomodidad y confiabilidad los hacen inadecuados para el diagnóstico subclínico. El denominado ‘test de serotonina’ descrito aquí pueden ser complementario para examinar las características genéticas de

la enfermedad de Parkinson, como la implicación de LRRK2 (quinasa 2 repetida rica en leucina) (Cookson MR., 2010), PINK1 (quinasa putativa 1 inducida por PTEN) o PRKN (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase) (Clarke CE., 2007), ya que la mayoría de las causas monogénicas son incompletamente penetrantes y las pruebas genéticas positivas en individuos asintomáticos no proporcionan suficiente evidencia diagnóstica de EP subclínica. Por el contrario, este estudio funcional de VS en plaquetas sugiere que dicho enfoque podría ser capaz de detectar la EP en una gran proporción de pacientes (aproximadamente el 77%) y quizás incluso en más pacientes (aproximadamente el 91%) si el componente no específico es removido. Frente a estos datos un estudio de video ciego de DaTSCAN mostró altas tasas de error de falsos positivos (17.4-26.1%) y negativos (6.7-20%) en el diagnóstico de EP y poca concordancia entre los expertos en trastornos del movimiento, lo que ilustra la fragilidad y la subjetividad del diagnóstico clínico en pacientes temblorosos (Bajaj et al., 2010).

Múltiples mecanismos pueden impulsar el deterioro funcional de las VS, que involucran V-ATPasa, VMAT2, VNUT u otras proteínas/factores, y la EP podría reflejar cualquiera o una combinación de estos. Sin embargo, el único considerado hasta la fecha es el de VMAT2, que se redujo notablemente en las VS estriatales postmortem de las neuronas dopaminérgicas (Pifl et al., 2014). Además, la difusión espontánea significativa de 5-HT de las plaquetas de la EP sugiere una retención deficiente de aminas por parte de las VS.

Como la captación de 5-HT es el resultado de más factores, no fue nuestro objetivo proponer que los eventos descritos aquí se deban al mal funcionamiento de alguna proteína específica. Se propone que el ‘test de serotonina’ se puede usar para el diagnóstico subclínico de la EP y para lograr un diagnóstico diferencial de Parkinsonismo. Dado que la neurodegeneración de la EP comienza décadas antes de la aparición de los síntomas motores y que la falla del VS puede ocurrir años antes de la aparición de los primeros síntomas, los ensayos de 5-HT podrían detectar la enfermedad décadas antes de la aparición de sus primeros síntomas. El ‘test de serotonina’ es barato, rápido y confiable, y se pueden implementar en cualquier laboratorio clínico. Además, el análisis funcional del recambio de 5-HT también constituye una herramienta muy prometedora para el descubrimiento de fármacos modificadores de la enfermedad que se pueden realizar directamente en la célula del paciente.

CONCLUSIONES

1. El contenido nativo de serotonina en plaquetas de pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática es significativamente menor en un 49.18 – 60.92% respecto a los voluntarios clínicamente sanos y en un 37.18 – 56.85% frente a pacientes con otros parkinsonismos, sin existir diferencias significativas entre estos dos últimos grupos de estudio.
2. Existe una disfunción en los mecanismos de captación vesiculares en plaquetas de pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática en un 34.57 – 42.94% respecto a los grupos clínicamente sanos y en un 24.51 – 42.51% frente a parkinsonismos, visible en la valoración de la captación tanto total como intrínseca, siendo esta más acusada (49.98 – 58.61% de diferencia entre Enfermedad de Parkinson idiopática y participantes clínicamente sanos).
3. La determinación de la componente de captación inespecífica plaquetaria resulta de importancia para la correcta valoración de la captación y compartimentalización vesicular de serotonina. De esta forma, se establecen valores umbrales funcionales de los parámetros que conllevan dicha captación y acumulación para la correcta clasificación y diferenciación de los participantes de este estudio.
4. La observación de voluntarios clínicamente sanos con parámetros próximos a pacientes de Enfermedad de Parkinson idiopática y/o alterados y su posterior correlación y seguimiento clínico indica la bondad de este denominado ‘test de serotonina’ como marcador de diagnóstico preclínico de dicha enfermedad.
5. Los pacientes con diversos parkinsonismos presentan valores similares a los encontrados en el grupo de voluntarios clínicamente sanos, por lo que se propone el ‘test de serotonina’ como un posible método de diagnóstico diferencial de Enfermedad de Parkinson idiopática. No obstante, la elevada heterogeneidad encontrada en este grupo de pacientes, derivada de sus diversas etiologías, precisa de un estudio mayor y más profundo para corroborar dicha propuesta.
6. La liberación de serotonina plaquetaria estimulada por trombina fue ligera pero significativamente menor (10%) en pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática con respecto a voluntarios clínicamente sanos, con una componente de difusión pasiva significativamente mayor (105%). Estos datos son un claro indicativo de que los mecanismos vesiculares de acumulación de aminas biógenas de pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática también se ven afectados.

7. Si bien no existen diferencias significativas en la componente de difusión pasiva, la liberación de serotonina plaquetaria estimulada por trombina fue significativamente menor (20%) en pacientes con diversos parkinsonismos con respecto a voluntarios clínicamente sanos. Este sorprendente hecho necesita de un estudio más exhaustivo, si bien se puede tener relación con defectos en los mecanismos de secreción sin verse comprometida la funcionalidad de las propias vesículas secretoras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albillos, A. D. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, doi: 10.1038/39081.
2. Aleksovski, B., Novotni, A., Vujović, V., Rendevski, 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 ClinPract*, 1-10.
3. Bajaj, N. G. (2010). Accuracy of clinical diagnosis in tremulous parkinsonian patients: a blinded video study. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, doi: 10.1136/jnnp.2009.193391.
4. Boullin, D. J. (1970). Accumulation of dopamine by blood platelets from normal subjects and parkinsonian patients under treatment with L-DOPA. *British Journal of Pharmacology*, 10.1111/j.1476-5381.1970.tb09904.x.
5. Brunk, I., Blex, C., Rachakonda, S., Höltje, M., Winter, S, Pahner, I., Walther, D. J., Ahnert-Hilger, G. (2006). The First Luminal Domain of Vesicular Monoamine Transporters Mediates G-protein-dependent Regulation of Transmitter Uptake, *Journal of Biological Chemistry*, doi: 10.1074/jbc.M603204200
6. Camacho, M. M. (2008). Intravesicular Calcium Release Mediates the Motion and Exocytosis of Secretory Organelles. *Journal of Biological Chemistry*, doi: 10.1074/jbc.M800552200.
7. Clarke, C. E. (2007). Parkinson's Disease. *British Medical Journal*, doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.39289.437454.AD> .
8. Cookson, M. R. (2010). The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nature Reviews*, doi: 10.1038/nrn2935.
9. Deupree, J.D., Smith, S.D., Kratochvil, C.J., Bohac, D., Ellis, C.R., Polaha, J., Bylund, D. B. (2006) Possible Involvement of Alpha-2A Adrenergic Receptors in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Radioligand Binding and Polymorphism Studies. *American Journal of Medical Genetics*, doi: 10.1002/ajmg.b.30371
10. Devine, M. G. (2011). Parkinson's disease and α -synuclein expression. *Movement Disorders*, doi: 10.1002/mds.23948.
11. Dominguez N, Estevez-Herrera J, Borges R, Machado JD. The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. *FASEB J*. 2014 Nov;28(11):4657-67. doi: 10.1096/fj.14-249607. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25077558.
12. Eisenhofer, G. K. (2004). Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews*, doi: 10.1124/pr.56.3.1.
13. Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., & Moisan, F. (2016). *Epidemiology of Parkinson disease*. Obtenido de 10.1016/j.neurol.2015.09.012

14. Estévez-Herrera J, Domínguez N, Pardo MR, González-Santana A, Westhead EW, Borges R, Machado JD. ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 12;113(28):E4098-106. doi: 10.1073/pnas.1600690113. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27342860; PMCID: PMC4948319.
15. Fitch-Tewfik, J. L., Flaumenhaft, R. (2013). Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Frontiers y Endocrinology*, doi: 10.3389/fendo.2013.00077
16. García, S., López, B., Meza, E., de Jesús, A., & Coral, R. (2010). *MediGraphic*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2010/mim104h.pdf>
17. Ge, S. W. (2011). Quantal Regulation and Exocytosis of Platelet Dense-Body Granules. *Biophysical Journal*, doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.001.
18. Goldstein, D. S. (2014). Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.006.
19. Goldstein, D. S., Sullivan, P., Holmes, C., Miller, G. W., Alter, S., Strong, R., . . . Sharabi, Y. (2013). Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, doi: 10.1111/jnc.12345.
20. Koçer, A., Yaman, A., Niftaliyev, E., Dürüyen, H., Eryılmaz, M., Koçer, E. (2013). Assessment of Platelet Indices in Patients with Neurodegenerative Diseases: Mean Platelet Volume Was Increased in Patients with Parkinson's Disease. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, doi:10.1155/2013/986254
21. Laperle, A. S. (2020). iPSC modeling of young-onset Parkinson's disease reveals a molecular signature of disease and novel therapeutic candidates. *Nature Medicine*, doi: 10.1038/s41591-019-0739-1.
22. Laperle, A., Sances, S., Yucer, N., Dardov, V., García, V., Ho, R., . . . Svendsen, C. (2020). iPSC modeling of young-onset Parkinson's disease reveals a molecular signature of disease and novel therapeutic candidates. *Nature Medicine*, doi: 10.1038/s41591-019-0739-1), 289-299.
23. Machado, D. J., Montesinos, M. S., Borges, R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol. Exocytosis and Endocytosis*, 440,297-313.
24. Martínez-Fernández, R., Gasca-Salas, C., Sánchez-Ferro, Á., & Obeso, J. Á. (2016). Parkinson's disease: a review. *Revista Médica Clínica Condes*, 363-379.
25. Masato, A., Plotegher, N., Boassa, D., & Bubacco, L. (2019). Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *BioMedCentral - Molecular Neurodegeneration*, doi: 10.1186/s13024-019-0332-6.
26. Meiser, J. W. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, doi: 10.1186/1478-811X-11-34.
27. Moisan, F., Sofiane, K., Mohamed, F., Canonico, M., Le Guem, M., Quintin, C., & Carcaillon, L. (2015). Parkinson disease male-to-female ratios increase. *Movement disorder*, doi: 10.1136/jnnp-2015-312283.

28. Montesinos, M., Machado, J., Camacho, M., Díaz, J., Morales, Y., Álvarez de la Rosa, D., . . . Borges, R. (2008). The Crucial Role of Chromogranins in Storage and Exocytosis Revealed Using Chromaffin Cells from Chromogranin A Null Mouse. *Journal of Neuroscience*, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5292-07.2008.
29. Moscharov, E. V., Larsen, K. E., Kanter, E., Phillips, K. A., Wilson, K., Schmitz, Y., Krantz, D. E., Kobayashi, K., Edwards, R. H., Sulzer, D. (2009). *Neuron*, doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.033.
30. Moscharov E. V., G. L. (2003). Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, doi: 10.1523/jneurosci.23-13-05835.2003.
31. Neurología, S. E. (2019). *Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología 2019. 4. Guía oficial de recomendaciones clínicas en la enfermedad de Parkinson*. Madrid: SEN.
32. Omiatek, D. B. (2013). The real catecholamine content of secretory vesicles in the CNS revealed by electrochemical cytometry. *Scientific Reports*, doi: 10.1038/srep01447.
33. Pei, Y., Maitta, R. W. (2019). Alpha synuclein in hematopoiesis and immunity. *Heliyon CellPress*, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02590
34. Peñas Domingo, E., Gálvez Sierra, M., Marín Valero, M., & Pérez-Olivares Castiñeira, M. (2015). *Libro Blanco del Párkinson en España*. Madrid: Real Patronato sobre Discapacidad (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad).
35. Pereira, D. B. (2012). Mechanisms of dopamine quantal size regulation. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, doi: 10.2741/4083.
36. Pifl C, R. A. (2014). Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum,. *Journal of Neuroscience*, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5456-13.2014.
37. Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G., Brundin, P., & Volkmann, J. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, doi: 10.1038/nrdp.2017.13.
38. Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., . . . Hofene, D. (2015). The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Movement Disorders*, doi: 10.1002/mds.26077.
39. Rosado JA. Acidic Ca(2+) stores in platelets. *Cell Calcium*. 2011 Aug;50(2):168-74. doi: 10.1016/j.ceca.2010.11.011. Epub 2010 Dec 17. PMID: 21167599
40. Sharda, A., Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000 Research*, doi: 10.12688/f1000research.13283.1
41. Shi, M. B. (2010). Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Annals of Neurology*, doi: 10.1002/ana.22311.
42. Stahl SM. The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch Gen Psychiatry*.

- 1977 May;34(5):509-16. doi: 10.1001/archpsyc.1977.01770170019001. PMID: 140632.
43. 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>
 44. Winkler, H. (1997). Membrane Composition of Adrenergic Large and Small Dense Core Vesicles and of Synaptic Vesicles: Consequences for Their Biogenesis. *Neurochemical Research*, doi: 10.1023/A:1022410506476.
 45. Yamaguchi K, Tomasi L, Cote J, et al. Serotonin content of platelet enriched plasma in Parkinson patients prior and during treatment with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). *Biochem Med* 1972;6: 210–215

MATERIAL
SUPPLEMENTARIO

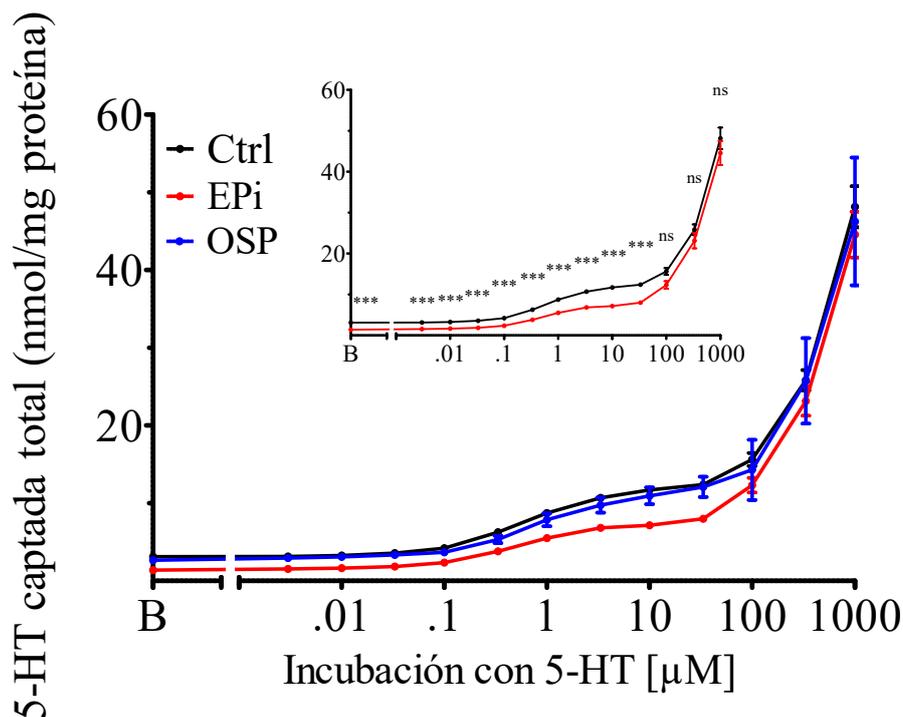


Figura suplementaria 1 – Curvas de captación total de serotonina en plaquetas de los grupos participantes. Las plaquetas se aislaron utilizando el protocolo optimizado para medir la serotonina descrito en Material y Métodos. Panel mayor: Se muestran las curvas y datos (medias \pm SEM) de captación total en los grupos voluntarios clínicamente sanos (Ctrl; negro, n = 30), con enfermedad de Parkinson idiopática (EPI; rojo, n = 21) y otros síndromes parkinsonianos (OSP; azul, n = 10). Panel menor: Gráfica comparativa entre Ctrl y EPI. ***, p<0.001; ns, no significativo (ANOVA).

Tabla S1| Contenido de serotonina en plaquetas de individuos supuestamente sanos.

| ID | Basal | Capt | Captspc | Notas |
|------|-------|-------|---------|---|
| 105Z | 1.74 | 4.18 | - | Aortitis sífilítica, desordenes plaquetarios, dislipemia, tabaquismo, Bz |
| 535E | 1.69 | 5.21 | - | Desordenes plaquetarios |
| 780K | 1.09 | 2.85 | - | ≥ 2 síntomas no motores, descoordinación del movimiento, hipertiroidismo, ≥ 2 factores de riesgo vascular, Bz, ° |
| 025F | 1.02 | 11.51 | - | ≥ 2 síntomas no motores, síndrome ansioso, Bz, historial familiar de EPI |
| 213J | 0.46 | 8.13 | - | ≥ 2 síntomas no motores, rinitis, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, historial familiar de EPI |
| 876D | 1.32 | 4.49 | - | Sin síntomas no motores, infarto agudo de miocardio, hiperplasia benigna de próstata, desórdenes plaquetarios, ≥ 2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, AG-AC |
| 553T | 0.23 | 11.19 | - | Depresión, pérdida de audición, síndrome ansioso, hipotiroidismo, Bz, AE, NI, historial familiar de EPI |
| 277R | 0.23 | 5.62 | 3.41 | Depresión, exposición a productos tóxicos, hiperuricemia, anemia por deficiencia de hierro, ≥ 2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, Bz, historial familiar de EPI, † |
| 540P | 0.47 | 11.49 | 10.52 | Depresión, dislipemia |
| 845V | 0.57 | 13.05 | 7.21 | Estreñimiento, litiasis renal |
| 700N | 1.72 | 12.28 | 8.11 | Sin síntomas no motores, diversas alergias, osteoartritis, artritis, pólipos en el intestino, intestino irritable, vacuna Pfizer Covid19, ≥ 2 factores de riesgo vascular, historial familiar de EPI |
| 895B | 0.44 | 9.20 | 6.83 | ≥ 2 síntomas no motores, síndrome ansioso, hipotiroidismo, insuficiencia venosa crónica, Bz |
| 958M | 3.17 | 6.85 | - | Meningitis, fractura de clavícula, hipertiroidismo, ≥ 2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, AG-AC, AE |
| 524W | 2.92 | 6.59 | 5.52 | Mielofibrosis, ictus, asma bronquial, ≥ 2 factores de riesgo vascular, AG-AC |
| 316A | 1.79 | 4.99 | - | Depresión, hemiplejía vascular, ≥ 2 factores de riesgo vascular, tabaquismo y enolismo, AG-AC, Bz |
| 705S | 3.26 | 7.63 | - | Sin síntomas no motores |
| 421G | 2.28 | 7.71 | - | Síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, bronquitis, osteoporosis, extrasístole supraventricular aislada, enolismo |
| 817S | 4.22 | 7.84 | - | Sin síntomas no motores, migrañas |

Tabla S1| Contenido de serotonina en plaquetas de individuos supuestamente sanos (continuación).

| ID | Basal | Capt | Captspc | Notas |
|------|-------|------|---------|---|
| 280Z | 2.54 | 7.84 | - | Depresión, intestino irritable, hernia hiatal, exposición a tóxicos |
| 641L | 1.84 | 7.64 | - | Trastornos del sueño, rinitis alérgica, dermatitis atópica, historial familiar de EPI |
| 890H | 2.27 | 7.98 | - | Sin síntomas no motores, Intestino irritable, colecistectomía, desordenes plaquetarios, tabaquismo, historial familiar de EPI |
| 945N | 1.79 | 6.69 | - | Sin síntomas no motores, diversas alergias, cesárea, hepatitis B (curada), DIU anticonceptivo, historial familiar de EPI |
| 267P | 2.07 | 7.49 | 4.97 | ≥2 síntomas no motores, anemia, ≥2 factores de riesgo vascular, AG-AC, Bz, Op |
| 207D | 2.24 | 6.13 | 4.69 | Sin síntomas no motores, historial familiar de EPI |
| 587Z | 3.31 | 7.49 | 5.91 | Sin síntomas no motores |
| 841E | 2.61 | 8.71 | 6.45 | Depresión, migraña, síndrome ansioso, rinitis alérgica, intolerancia a la lactosa, dislipemia, historial familiar de EPI |

Tabla S2| Outliers. Pacientes diagnosticados de EPI con resultados normales.

| ID | Basal | Capt | Captspc | Notas |
|------|-------|-------|---------|---|
| 565G | 2.69 | 9.82 | 4.67 | ≥2 síntomas no motores, desordenes plaquetarios, ADNE, iMAO, ††† |
| 076L | 3.26 | 8.61 | - | Sin síntomas no motores, cardiopatía isquémica crónica, hiperplasia benigna de próstata, anemia, ≥2 factores de riesgo vascular, enolismo, LD, ADNE, AG-AC, ††† |
| 591N | 2.77 | 7.66 | - | Trastornos del sueño, esofagitis, varios adenomas, hiperplasia benigna de próstata, litiasis renal, ≥2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, LD, iCOMT, Bz, ††† |
| 754F | 2.74 | 9.52 | - | ≥2 síntomas no motores, cáncer de mama, hipertiroidismo, sepsis posgripal, diplopia, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, AG-AC, NI, † |
| 839N | 2.19 | 8.26 | - | ≥2 síntomas no motores, hipertensión arterial, LD, AG-AC |
| 938E | 2.05 | 6.45 | - | Depresión, traumatismo craneoencefálico grave, desordenes plaquetarios, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, iCOMT, iMAO, † |
| 813X | 1.95 | 5.03 | - | ≥2 síntomas no motores, exposición a tóxicos, hernia de hiato, hernia discal, LD, ADNE |
| 781M | 4.25 | 7.44 | 4.79 | ≥2 síntomas no motores, cancer de mama, hipotiroidismo, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, iCOMT, Bz |
| 568T | 5.17 | 12.11 | 8.88 | ≥2 síntomas no motores, hepatitis B crónica, hiperplasia benigna de próstata, cardiopatía isquémica crónica, dislipemia, LD, iMAO, AG-AC, Bz, historial familiar de EPI, †† |
| 817K | 3.46 | 8.31 | 5.22 | ≥2 síntomas no motores, vertigo, hiperplasia benigna de próstata, hipertensión arterial, LD, iCOMT, ADNE, iMAO, Bz |
| 209J | 2.52 | 8.11 | 4.77 | ≥2 síntomas no motores, hipotiroidismo, osteoartritis, enfermedad celiaca, gastritis, dislipemia, LD, ADNE, iMAO, Bz, historial familiar de EPI, ††† |
| 143E | 1.98 | 6.19 | 3.22 | ≥2 síntomas no motores, hipotiroidismo, epilepsia (joven), artrosis, dislipemia, LD, ††† |
| 175F | 3.28 | 9.58 | 6.50 | ≥2 síntomas no motores, osteoporosis, exposición a tóxicos, LD, ADNE, iMAO, Bz, ††† |
| 648D | 2.22 | 6.94 | 3.41 | Trastornos del sueño, exposición a tóxicos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, plaquetopenia, Diabetes Mellitus, LD, ADNE, iMAO, Bz, ††† |
| 672H | 4.66 | 9.60 | 6.96 | ≥2 síntomas no motores, EPI juvenil, tinnitus, hernia inguinal, obstrucción pilórica al nacer, niveles altos de bilirrubina, niveles bajos de triglicéridos, LD, ADNE, iMAO, Bz, ††† |
| 696G | 3.86 | 7.87 | 3.71 | ≥2 síntomas no motores, gastritis atrófica, deficiencia de vitamina B12 y D, LD, ADNE, iMAO, ††† |
| 813B | 3.86 | 8.69 | 4.97 | ≥2 síntomas no motores, hipertensión arterial, LD, iCOMT, iMAO, Bz, ††† |
| 329Q | 2.39 | 8.78 | 4.36 | Trastornos del sueño, espondiloartritis anquilosante, tabaquismo, LD, ADNE, iMAO, ††† |
| 544J | 0.28 | 10.11 | - | ≥2 síntomas no motores, hiperhidrosis, hiperparatiroidismo, intolerancia a la lactosa, LD, iCOMT, ADNE, iMAO, historial familiar de EPI |
| 714L | 1.29 | 10.03 | 6.15 | ≥2 síntomas no motores, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, hipotiroidismo, ≥2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, LD, ADNE, iMAO, Bz, †† |
| 081P | 1.56 | 11.60 | - | Depresión, hipertensión arterial, LD, iMAO, Bz, NI |
| 498H | 1.22 | 11.68 | 6.80 | Sin síntomas no motores, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, hiperplasia benigna de próstata, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, iMAO, ACh-A |
| 812M | 0.11 | 10.19 | 4.42 | Depresión, hipotiroidismo, obesidad, dislipemia, LD, iCOMT, ADNE, iMAO, Op |
| 572Q | 1.48 | 10.38 | 6.85 | ≥2 síntomas no motores, asma, alergia al polen y a los ácaros, tumor en el muslo izquierdo, hipertensión arterial, LD, ADNE, iMAO, historial familiar de EPI |
| 755N | 1.21 | 9.95 | 6.02 | Depresión, deficiencia de vitamina B12, anemia ferropénica, alergia a penicilinas y metazolol, Diabetes Mellitus, LD, iMAO |
| 166X | 0.37 | 11.45 | 5.92 | ≥2 síntomas no motores, apnea del sueño, cistitis hemorrágica, cáncer de próstata (2002), disfagia, hernia de hiato, desordenes plaquetarios, tabaquismo, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, ADNE, iMAO, historial familiar de EPI, †† |
| 948B | 0.08 | 10.97 | 3.51 | Depresión, posible alergia a la doloxetina y la sacarosa, dislipemia, LD, Amnt, AG-AC, Bz |
| 184A | 0.10 | 11.68 | 5.71 | Depresión, asma, posible alergia a la amantadina, tabaquismo, LD, ADNE, iMAO, Bz |

| Tabla S3 Contenido de serotonina plaquetaria de pacientes con síndromes parkinsonianos (Parkinson plus o Parkinson atípico). | | | | | |
|---|-------|-------|----------|-------------------------------------|--|
| ID | Basal | Capt | Capt spc | Diagnóstico | Notas |
| 459H | 1.71 | 16.11 | - | | ≥2 síntomas no motores, lupus eritematoso sistémico, LD, Bz, ° |
| 087G | 3.13 | 10.85 | - | Tembler esencial | Hipertensión arterial, tabaquismo |
| 729N | 2.42 | 14.75 | - | Parkinsonismo farmacológico | Desordenes psiquiátricos, hipertensión arterial, LD, Bz |
| 063K | 1.14 | 7.40 | - | Síndrome tremórico lateral | Sin síntomas no motores, meningitis, osteoartritis, insuficiencia venosa crónica, dislipemia, LD, iCOMT, AG-AC, Bz, Op, ° |
| 649B | 4.91 | 7.67 | - | Parkinsonismo farmacológico | Estreñimiento, intoxicación por organofosforados, proctosigmoiditis, osteoartritis, hiperplasia benigna de próstata, poliposis colónica, ≥2 factores de riesgo vascular, tabaquismo, LD, AG-AC, †† |
| 713M | 2.24 | 7.75 | - | Tembler esencial | Quistes aracnoideos, tinnitus, hipertensión arterial, exposición a tóxicos, enolismo, AG-AC, Bz |
| 157N | 3.70 | 8.12 | - | Atrofia multisistémica | ≥2 síntomas no motores, desnutrición, deterioro cognitivo, desordenes plaquetarios, enolismo, LD, iCOMT, ADNE, Bz, NI, †† |
| 234R | 0.25 | 6.86 | - | Parálisis supranuclear progresiva | ≥2 síntomas no motores, dislipemia, LD, AG-AC, AE |
| 357Z | 0.23 | 4.96 | - | Atrofia multisistémica | ≥2 síntomas no motores, insuficiencia venosa periférica, LD, Bz, historial familiar de EPI |
| 428X | 2.45 | 9.41 | - | Tembler esencial | ≥2 síntomas no motores, temblor fisiológico exacerbado, tabaquismo, historial familiar de EPI, ° |
| 516W | 4.12 | 8.67 | - | Parkinson Plus | ≥2 síntomas no motores, anemia ferropénica, LD, ADNE, iMAO, historial familiar de EPI |
| 151K | 2.04 | 11.38 | 8.64 | Tembler esencial | Sin síntomas no motores, hiperplasia benigna de próstata, hipertensión arterial, ADNE |
| 434V | 2.84 | 14.54 | 9.01 | Parkinson Plus | ≥2 síntomas no motores, criterios de EPI pero con una sola evaluación, LD, IMAO |
| 270D | 2.18 | 11.25 | 9.20 | Parkinson Plus (Taopatía) | Sin síntomas no motores, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, AG-AC |
| 095A | 2.42 | 9.48 | 6.93 | Parkinson Plus | Sin síntomas no motores, cáncer de próstata, cardiopatía hipertensiva, parkinsonismo con posible evolución a EPI, hipertensión arterial, LD, ADNE |
| 642A | 1.94 | 10.16 | 6.20 | Parkinsonismo farmacológico | Depresión, hernia de hiato, pólipos de colon, deficiencia de vitamina B12, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, Bz |
| 088X | 5.05 | 14.37 | 10.61 | Tembler esencial | Sin síntomas no motores, desordenes plaquetarios |
| 715Q | 2.68 | 7.62 | 5.27 | Síndrome tremórico lateral | ≥2 síntomas no motores, parkinsonismo con DaTScan patológico no congruente, hipertensión arterial, LD, iMAO, NI, historial familiar de EPI, ††† |
| 585X | 1.54 | 5.69 | 3.15 | Síndrome tremórico (cuasitremórico) | Sin síntomas no motores, fibrilación auricular, nefroangiosclerosis, glomerulonefritis membranosa, duodenitis crónica, infección del tracto urinario, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, ADNE, AG-AC |
| 134A | 0.19 | 6.67 | 4.23 | Síndrome tremórico lateral | ≥2 síntomas no motores, mioclonías, blefaroespanto, pólipos de colon, hipertensión arterial, LD, NI, ° |
| 946H | 1.76 | 8.09 | 4.41 | Tembler esencial | ≥2 síntomas no motores, exposición a tóxicos, desordenes plaquetarios, epiteloma de células basales, boca y ano urentes, vértigo periférico, osteoartritis, hiperplasia benigna de próstata, asma, hipertensión arterial, Bz, AE |
| 035X | 3.45 | 15.50 | 9.90 | Parkinsonismo farmacológico | Sin síntomas no motores, exposición a tóxicos, desordenes plaquetarios, dislipemia, enolismo, LD, iCOMT, ADNE, iMAO, ††† |
| 326R | 2.16 | 7.88 | 5.26 | Síndrome tremórico bradiquinético | Sin síntomas no motores, síndrome tremórico bradiquinético, cervicartrosis, exposición a tóxicos, desordenes plaquetarios, ≥2 factores de riesgo vascular, AG-AC, ° |
| 960E | 3.56 | 17.16 | 9.81 | Tembler esencial | Sin síntomas no motores, hipertiroidismo subclínico, miopía, síndrome del túnel carpiano, listesis lumbar, trombosis de miembros inferiores (stent), dislipemia, tabaquismo, AG-AC, Bz, Op, AE, ° |
| 918E | 3.68 | 7.53 | 5.55 | Tembler esencial | ≥2 síntomas no motores, temblor esencial plus, disfgia, hipotiroidismo subclínico, Bz |
| 264A | 5.73 | 11.33 | 6.33 | Parkinsonismo farmacológico | ≥2 síntomas no motores, DaTSCAN atípico, posible parkinsonismo farmacológico ligeramente degenerativo, linfoma (2010), trombosis venosa, ≥2 factores de riesgo vascular, LD, Bz, AE, NI, † |
| 541S | 2.83 | 9.97 | 7.68 | Demencia de cuerpos de Levy | Trastornos del sueño, psoriasis, desordenes plaquetarios, LD, AG-AC |
| 031E | 3.55 | 10.26 | 6.37 | Tembler esencial | Trastornos del sueño, temblor esencial plus con posible hipocaptación derecha, dislipemia, LD, historial familiar de EPI |
| 401X | 3.39 | 8.34 | 5.94 | Distonía focal | Sin síntomas no motores, ptosis palpebral congénita, hemia discal, gastritis, hiperplasia benigna de próstata, hipertensión arterial, tabaquismo, ††† |

Las personas anónimas fueron etiquetadas utilizando los últimos 3 dígitos y la letra de su número de identificación español. Los datos de laboratorio, obtenidos por duplicado, están expresados como nmol de serotonina (5-HT)/mg de proteína: **Basal**, contenido nativo de 5-HT; **Capt**, captación de 5-HT después de 2h de incubación con 5-HT (10 µM); **Capt spc**, captación específica de 5-HT después de 30 min de incubación con reserpina (1 µM) antes y durante la incubación de 2 h con 5-HT. Los valores en rojo se consideran "patológicos". Obsérvese que los síntomas no motores incluyen trastornos del sueño, estreñimiento, hiposmia y depresión, y los factores de riesgo vascular incluyen Diabetes Mellitus, hipertensión arterial y dislipidemias. "EPI", enfermedad de Parkinson idiopática. Fármacos: LD, L-DOPA/Carbidopa; iCOMT, inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa; ADNE, agonistas dopaminérgicos no ergolínicos; iMAO, inhibidores de la monoaminoxidasa; ACh, antagonistas colinérgicos; Amnt, amantadina; AG-AC, fármacos antiagregantes-anticoagulantes; Bz, benzodiazepinas; Op, opioides; AE, fármacos antiepilépticos; NI, fármacos neurolépticos. Símbolos: ° DaTSCAN normal con captación normal y simétrica; † DaTSCAN patológico con hipocaptación unilateral; †† DaTSCAN patológico con hipocaptación bilateral; ††† DaTSCAN patológico con hipocaptación bilateral y asimétrica; †††† DaTSCAN patológico con ausencia total de captación.