

## LAS PLAQUETAS COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES EXTRAPIRAMIDALES

Ernesto Bonilla\*

### CONSIDERACIONES GENERALES

El transporte de serotonina hacia el interior de las plaquetas es un proceso activo acoplado a la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-asa}$  y absolutamente dependiente de la presencia de iones sodio (32, 33). La combinación de técnicas bioquímicas y electronomicroscópicas ha demostrado que la serotonina de las plaquetas, en conejos y conejillos de India, se almacena junto con calcio, ATP y ADP formando complejos de alto peso molecular (10, 26, 37) en el interior de un tipo de gránulos de alta densidad electrónica (cuerpos densos). En otros trabajos también se ha demostrado que los cuerpos densos de las plaquetas humanas son los sitios de almacenamiento de ATP, ADP, calcio y serotonina (11, 12, 16, 28). El ADP almacenado en los cuerpos densos representa el 60% del total encontrado en plaquetas humanas (38). El ADP intragranular corresponde al "pool de almacenamiento". El "pool metabólico" es el que participa activamente en el metabolismo. Holmsen ha demostrado que al estimular las plaquetas con trombina o colágeno, el ADP liberado (responsable de la segunda fase de agregación) se deriva del pool de almacenamiento (17).

El ATP plaquetario también se encuentra compartimentalizado en un pool de almacenamiento intragranular (cuerpos densos), que se libera con el ADP durante la reacción de liberación, y un segundo pool metabólico. Estudios recientes sugieren que tanto el ADP como el ATP intragranular pueden intercambiarse lentamente con el pool metabólico (27).

---

\* Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela.

## Reacción de liberación.

La reacción de liberación es el proceso secretorio mediante el cual las sustancias almacenadas en los gránulos son excluidas de las plaquetas. Puede inducirse con epinefrina, trombina, colágeno y ADP. Los cambios estructurales asociados a la liberación no están bien conocidos. La membrana plaquetaria se invagina en muchos puntos para formar un sistema de canales tortuosos: sistema de conexión con la superficie. Después de la estimulación con inductores de la liberación, los gránulos plaquetarios se reúnen en el centro de la célula y son rodeados por una banda de microtúbulos (39). Existen evidencias de que el contenido de los gránulos se elimina por exocitosis a través de las membranas del sistema de conexión con la superficie (40). El mecanismo de liberación de las sustancias almacenadas en los gránulos o cuerpos densos parece ser diferente al de la liberación del contenido de los gránulos alfa (hidrolasas ácidas y catepsinas). Por ejemplo, la epinefrina, ADP y bajas concentraciones de colágeno (5-7  $\mu\text{g/ml}$ ), liberan solamente los constituyentes de los gránulos densos (Liberación I). La trombina y altas concentraciones de colágeno pueden liberar el contenido tanto de los gránulos densos como de los gránulos alfa (Liberación II) (13). La aspirina inhibe la Liberación I, pero no la Liberación II (18). Por otro lado, las prostaglandinas desempeñan un papel importante como mediadores de la Liberación I y, como consecuencia, de la segunda fase de agregación. Cuando las plaquetas son estimuladas con varios inductores de la liberación, el ácido araquidónico (originado posiblemente por hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana) es convertido por una ciclooxigenasa en un endoperóxido cíclico lábil, precursor de las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$  (15, 29, 30, 41). El endoperóxido (pero no las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ ) puede inducir la Liberación I y producir la segunda fase de agregación. La aspirina inhibe la síntesis del endoperóxido y, como consecuencia, la segunda fase de agregación (38).

## PLAQUETAS COMO MODELO DE NEURONAS

Numerosos investigadores han propuesto a las plaquetas como modelo de neuronas aminérgicas del Sistema Nervioso Central (2, 24-26, 32-35); proposición que resulta especialmente atractiva para el estudio de la patología del SNC debido a la facilidad de obtener plaquetas en grandes cantidades mediante punción venosa. Abrams y Solomon (2) reportaron que la incorporación de norepinefrina (NE) por plaquetas humanas, se asemejó a la de las neuronas adrenérgicas. La captación fué marcadamente reducida por el frío, inhibidores metabólicos (cianuro, fluoruros, dinitrofenol), uabafna, quinidina y también al sustituir el sodio por litio en el medio de incubación, sugiriendo que el mecanismo de captación estaba relacionado con la bomba de sodio. Las drogas que interfieren con la incorporación de NE por las neuronas, tuvieron un efecto similar sobre las plaquetas,

La comparación detallada de las propiedades cinéticas, bioquímicas y farmacológicas, características del transporte de la serotonina en plaquetas y en cerebro, apoyan el concepto de que las plaquetas pueden servir de modelo para el estudio del transporte de la serotonina en neuronas del SNC (35). El transporte de serotonina puede ser discriminado en dos componentes: un sistema de transporte activo, saturable y de alta afinidad y un sistema de difusión pasiva, no saturable. El primero es directamente susceptible a la inhibición por varios agentes farmacológicos (uabaína, inhibidores metabólicos y antidepresivos tricíclicos) que no inhiben la difusión pasiva. Por otro lado, la fijación de serotonina por los gránulos aislados es susceptible a la inhibición por agentes farmacológicos (reserpina, tetrabenazina y N-etilmaleimida) que no inhiben ni la captación activa, ni la difusión pasiva (35).

In vitro, a bajas concentraciones de serotonina ( $10^{-7}$  M), las propiedades cinéticas y farmacológicas de su acumulación plaquetaria están determinadas principalmente por las características del mecanismo de transporte activo de la membrana de la plaqueta. A altas concentraciones ( $10^{-4}$  M), las características de la incorporación de serotonina parecen ser debidas, casi exclusivamente, a las propiedades del mecanismo de almacenamiento granular (35, 36). El sistema de transporte activo, saturable y de alta afinidad, parece tener, a la luz de estos trabajos, propiedades semejantes a la recaptura de serotonina por parte de las neuronas seronérgicas cerebrales.

Smith y cols (31), a diferencia de otros autores, comprobaron una disimilitud entre las constantes de Michaelis para la captación de serotonina por plaquetas y por sinaptosomas. Estos resultados fueron demostrados tanto en ratones como en monos. Por ello, previenen a los investigadores contra las inferencias prematuras sobre la patología del SNC, en base a datos encontrados en plaquetas.

La incorporación de dopamina se realiza casi enteramente a través de los canales de transporte de serotonina (23). Además, la descomposición oxidativa de la dopamina y la mayor contribución de la difusión pasiva, determinan que los estudios de la captación de dopamina sean menos confiables que los de serotonina (22). Resultados semejantes fueron reportados por Stahl y Meltzer (36), quienes demostraron que la acumulación de dopamina por plaquetas humanas, no es cinéticamente saturable ni inhibida por uabaína, inhibidores metabólicos, ni por antidepresivos tricíclicos. Observaron además, que la serotonina no compite con la dopamina, mientras que la reserpina, la tetrabenazina y el N-etil-maleimida inhiben la acumulación de dopamina por plaquetas. Se deduce de este trabajo que la incorporación de dopamina en plaquetas humanas, no llena los requisitos de un modelo de captación de alta afinidad, saturable e inhi-

bido por uabaína e inhibidores metabólicos, características éstas que si se presentan en las neuronas dopaminérgicas del SNC. Los hallazgos sugirieron a estos autores que la acumulación de dopamina por plaquetas humanas se realiza por difusión pasiva, seguida de captación de la amina por los gránulos densos.

Por otra parte, los estudios de Drummond y Gordon (14) ya habían demostrado que el haloperidol se fija a las plaquetas, pero no a receptores específicos comparables a los encontrados en cerebro. Este compuesto disminuyó la capacidad de fijación de la serotonina a sus dos receptores plaquetarios. Entre el haloperidol y la dopamina no encontraron ningún tipo de interacción. Por lo tanto, las plaquetas no pueden ser consideradas tampoco como modelo apropiado para la investigación de las interacciones dopamina-drogas a nivel molecular (7), pero sí para estudiar las interrelaciones serotonina-drogas (14).

¿Existen anomalías en el transporte plaquetario de neurotransmisores en los desórdenes extrapiramidales?

#### **Enfermedad de Parkinson.**

En 1970, Boullin y O'Brien investigaron la incorporación de dopamina en plaquetas de individuos normales y de enfermos parkinsonianos tratados con levodopa (6). Las plaquetas de estos últimos presentaron un incremento en la afinidad por el transporte de dopamina y una mayor liberación de este compuesto a partir de plaquetas previamente sobrecargadas durante 10 minutos de incubación. No observaron diferencia en la captación de serotonina por plaquetas de parkinsonianos aunque la concentración endógena de serotonina estaba reducida significativamente. El contenido de ATP era normal.

Yamaguchi y cols (43) demostraron que el contenido de serotonina en plasma rico en plaquetas, de parkinsonianos no tratados con levodopa, no se diferenció de los controles. La levodopa, al comienzo y al final de un largo tratamiento, no alteró la concentración de serotonina de las plaquetas.

Barbeau y cols (4) demostraron un descenso en la incorporación plaquetaria de dopamina en todos los parkinsonianos estudiados (tratados y no tratados). La medicación anticolinérgica y/o antihistamínica, con o sin amantadina, disminuyó aún más la incorporación de dopamina, mientras que la levodopa, administrada sola o combinada con RO 4-4602, provocó un aumento en los valores de incorporación orientándolos hacia la normalidad. La liberación de dopamina la encontraron también descendida y

paralela a la tasa de incorporación. El hallazgo de este déficit en la incorporación de dopamina es el argumento más fuerte a considerar en favor de la hipótesis de que la enfermedad de Parkinson es un desorden generalizado del sistema neuropigmentario que incluye a la sustancia nigra, el locus ceruleus, el núcleo dorsal del vago, ganglios simpáticos y otros sistemas periféricos que contienen dopamina (seno carotídeo, vasculatura renal y mesentérica, células C de la tiroides) (3).

Sin embargo, la relación entre estas anomalías en la incorporación plaquetaria de DA y el comportamiento de las neuronas dopaminérgicas centrales en la enfermedad de Parkinson, está oscurecida por el hallazgo ya descrito, de que las propiedades de la captación de DA por plaquetas no son estrictamente comparables a las de la captación de DA por sinaptosomas (35).

### Enfermedad de Huntington.

Aminoff y cols (1) reportaron un aumento en la captación de serotonina y dopamina por plaquetas de seis enfermos coreicos.

McLean y Nihei (20) observaron un aumento en la incorporación de dopamina, sin anomalías en la captación de serotonina, en seis pacientes estudiados y comparados con controles sanos.

Por el contrario, Butterworth y cols (8) y Caraceni y cols (9) observaron que las plaquetas de los pacientes con Corea de Huntington incorporaron dopamina en la misma medida que los controles. Semejantes resultados fueron demostrados por Bonilla y cols (5) quienes estudiaron la incorporación de dopamina por plaquetas de 21 hijos asintomáticos de enfermos coreicos. La incorporación de dopamina no se diferenció de los controles. Por esa razón, la captación de dopamina no puede ser utilizada como ensayo de predicción, como fue sugerido por Aminoff y cols (1) y McLean y Nihei (20).

Un estudio detallado más reciente reportado por Omenn y Smith (22) demostró que las propiedades cinéticas y farmacológicas de la captación de serotonina y dopamina, por plaquetas de enfermos coreicos y sus descendientes, no se diferencian de las observadas en los controles.

Todos los estudios señalados anteriormente, se han concretado a la caracterización de la incorporación de dopamina y serotonina por las plaquetas. Sin embargo, se ha descuidado el estudio de otras propiedades del funcionalismo plaquetario. Recientemente Diez-Ewald y cols (enviado a publicación) observaron que la segunda fase de agregación, en respuesta

a ADP, epinefrina y colágeno, está alterada en enfermos con Corea de Huntington. Comprobaron además, una disminución de la liberación de serotonina después de la inducción de la agregación con ADP. La captación de serotonina fue normal. La inhibición de la agregación plaquetaria la consideraron debida a una estimulación de la adenilato ciclasa o a una inhibición, bien sea de la ciclooxigenasa o de la fosfolipasa A2.

Las plaquetas humanas son una fuente abundante de monoaminoxidasa (MAO). La actividad de esta enzima puede estar alterada en algunas enfermedades del SNC: enfermedad de Parkinson (44), desórdenes afectivos (21), esquizofrenia (42). Recientemente Mann y Chiu (19) reportaron actividades de MAO significativamente elevadas en pacientes coreicos masculinos al compararlos con sus respectivos controles. No observaron diferencias en los enfermos del sexo femenino. En dos casos con condiciones clínicas favorables, encontraron valores bajos de MAO. Por otra parte, en otros dos enfermos que mejoraron con tratamiento, la actividad de MAO disminuyó a valores comparables a los dos primeros pacientes. Las implicaciones bioquímicas de estos hallazgos se desconocen. Las diferencias demostradas pudieran ser el reflejo de la alteración genética o ser producidas por la medicación que estaban recibiendo los enfermos. De allí la necesidad de repetir estos estudios en pacientes que no hayan recibido medicación previa. Si estos hallazgos se corroboran, el camino obvio a seguir sería demostrar si las diferencias en MAO preceden a la aparición de las manifestaciones clínicas, con lo cual este ensayo se transformaría en una técnica inapreciable para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

#### ABSTRACT

**The platelet as a model for the study of extrapyramidal diseases.** Bonilla E. (*Instituto de Investigación Clínica. Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela*). *Invest Clín* 20(2): 115-124, 1979.— Several investigators have proposed that the platelet could be considered as a model for aminergic neurons. This proposition looks specially attractive for researchers working on CNS diseases. A detailed comparison of the kinetic, biochemical and pharmacologic properties seem to support the concept that platelets behave as serotonergic neurons but not as dopaminergic neurons. Therefore, studies on dopamine uptake by platelets of parkinsonian and choreic patients can not be extrapolated to pathologic alterations in the basal ganglia. Platelet serotonin uptake has been found to be normal in both diseases.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AMINOFF MJ, TRENCHARD A, TURNER P, WOOD WG, HILLS M: Plasma uptake of dopamine and 5-hydroxytryptamine and plasma catecholamine levels in patients with Huntington's Chorea. *Lancet* 2: 1115-1116, 1974.
- 2- ABRAMS WB, SOLOMON HM: The human platelet as a pharmacologic model for the adrenergic neuron. The uptake and release of norepinephrine. *Clin Pharmacol Therap* 10: 702-709, 1969.
- 3- BARBEAU A: Parkinson's disease as a systemic disorder, in third Symposium on Parkinson's Disease (Gillingham FJ, and Donaldson IML, eds) p 66-73, E.&S. Livingstone LTD, Edinburgh, 1969.
- 4- BARBEAU A, CAMPANELLA G, BUTTERWORTH RF, YAMADA K: Uptake and efflux of  $^{14}\text{C}$ -dopamine in platelets: Evidence for a generalized defect in Parkinson's Disease. *Neurology* 25: 1-9, 1975.
- 5- BONILLA E, VARGAS-URRIBARRI N, NAVAS F: Uptake of  $^{14}\text{C}$ -dopamine in platelets of Huntington's Chorea patients and symptom-free offspring. *Lancet* 2: 161-162, 1978.
- 6- BOULLIN DJ, O'BRIEN RA: Accumulation of dopamine by blood platelets from normal subjects and parkinsonian patients under treatment with L-DOPA. *Br J Pharmac* 39: 779-788, 1970.
- 7- BOULLIN DJ, MOLYNEUX D, ROACH B: The binding of haloperidol to human blood platelets and interactions with 5-hydroxytryptamine and dopamine. *Br J Pharmac* 63: 561-566, 1978.
- 8- BUTTERWORTH RF, GONCE M, BARBEAU A: Platelet dopamine uptake in Huntington's Chorea and Gilles de la Tourette's Syndrome. Effect of Haloperidol. *Canad J Neurol Sci* 4: 285-288, 1977.
- 9- CARACENI T, CALDERINI G, CONSOLAZIONE A, RIVA E, ALGERI S, GIROTTI F, SPREAFICO R, BRANCIFORTI A, DALL'OLIO A, MORSELLI PL: Biochemical aspects of Huntington's Chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 40: 581-587, 1977.
- 10- DA PRADA M, PLETSCHER A, TRANZER JP: Storage of ATP and 5-hydroxytryptamine in blood platelets of guinea-pigs. *J Physiol (Lond)* 217: 679-688, 1971.
- 11- DA PRADA M, TRANZER JP, PLETSCHER A: Storage of 5-hydroxytryptamine in human blood platelets. *Experientia* 28: 1328-1329, 1972.

- 12- DAVID RB, WHITE JG: Localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets: an autoradiographic and ultrastructural study. *Br J Haematol* 15: 93-99, 1968.
- 13- DAY HJ, HOLMSEN H: Concepts of the blood platelet release reaction *Ser Haematol* 4: 3-27, 1971.
- 14- DRUMMOND AH, GORDON JL: Inhibition of 5-hydroxy-<sup>3</sup>H-tryptamine binding to rat blood platelets by 5-HT antagonists and uptake inhibitors *Br J Pharmacol* 55: 275 P, 1975.
- 15- HAMBERG M, SVENSSON J, WAKABAYASHI T: Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregations. *Proc Natln Acad Sci USA* 71: 345-349, 1974.
- 16- HOLMSEN H, DAY HJ, STORM E: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. *Biochim Biophys Acta* 186: 254-266, 1969.
- 17- HOLMSEN H: The platelet: its membrane, physiology and biochemistry. *Clin Haematol* 1: 235-266, 1972.
- 18- HOLMSEN H, SETKOWSKY CA, LAGES B: Content and thrombin-induced release of acid hydrolases in gel-filtered platelets from patients with storage pool disease. *Blood* 46: 131-142, 1975.
- 19- MANN J, CHIU E: Platelet monoamine oxidase activity in Huntington's Chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 41: 809-812, 1978.
- 20- McLEAN DR, NIHEI T: Uptake of dopamine and 5-hydroxytryptamine by platelets from patients with Huntington's Chorea. *Lancet* 1: 249-250, 1977.
- 21- MURPHY DL, WEISS R: Reduced monoamine oxidase in blood platelets from bipolar depressed patients. *Amer J Psychiat* 128: 35-41, 1972.
- 22- OMENN GS, SMITH L: Platelet uptake of serotonin and dopamine in Huntington's disease. *Neurology* 2: 300-303, 1978.
- 23- OMENN GS, SMITH LT: A common uptake system for serotonin and dopamine in human platelets. *J Clin Invest* 62: 235-240, 1978.
- 24- PAASONEN MK: Blood platelets as a model for aminergic neurons, in pharmacology and the future of man. *Proceedings of the 5th International Congress on Pharmacology, San Francisco, vol. 4, p. 328-342, Karger, Basel, 1973.*

- 25- PLETSCHER A: Metabolism, transfer and storage of 5HT in blood platelets. *Brit J Pharmacology* 32: 1-16, 1968.
- 26- PLETSCHER A, DA PRADA M, BERNEIS KH, TRANZER JP: New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Experientia* 27: 993-1002, 1971.
- 27- REIMERS HJ, PACKHAM MA, MUSTARD JF: Labeling of the releasable adenine nucleotide pool of human platelets. *Fed Proc* 34: 855, 1975.
- 28- SKAER RJ, PETERS PD, EMMINES JP: The localization of calcium and phosphorous in human platelets. *J Cell Sci* 15: 679-692, 1974.
- 29- SMITH JB, INGERMAN C, KOCSIS JJ: Formation of an intermediate in prostaglandin biosynthesis and its association with the platelet release reaction. *J Clin Invest* 53: 1468-1472, 1974.
- 30- SMITH JB, MACFARLANE DE: Platelets in the Prostaglandins (Ramwell PW, ed) Vol 2, p 293-343, Plenum Press, New York, 1974.
- 31- SMITH LT, HANSON DR, OMENN GS: Comparison of serotonin uptake by blood platelets and brain synaptosomes. *Brain Res* 146: 400-403, 1978.
- 32- SNEDDON JM: Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. *Brit J Pharmacol* 37: 680-688, 1969.
- 33- SNEDDON JM: Relationship between internal Na/K and the accumulation of <sup>14</sup>C-5-hydroxytryptamine by rat platelets. *Br J Pharmacol* 43: 834-844, 1971.
- 34- STAHL SM: The human platelet as a diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch Gen Psychiat* 34: 509-516, 1977.
- 35- STAHL SM, MELTZER HY: A kinetic and pharmacologic analysis of 5-hydroxytryptamine transport by human platelets and platelet storage granules: comparison with central serotonergic neurons. *J Pharmacol Exp Therap* 205: 118-132, 1978.
- 36- STAHL SM, MELTZER HY: The human platelet as a model for the dopaminergic neuron: kinetic and pharmacologic properties and the role of amine storage granules. *Exp Neurology* 59: 1-15, 1978.
- 37- TRANZER JP, DA PRADA M, PLETSCHER A: Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature (Lond)* 212: 1574-1575, 1966.

- 38- WEISS HJ: Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New England J Med* 293: 531-541, 1975.
- 39- WHITE JG: Platelet morphology, the circulating platelet (Johnson SA, ed) p 46-122, Academy Press. New York, 1971.
- 40- WHITE JG: Exocytosis of secretory organelles from blood platelets incubated with cationic polypeptides. *Am J Pathol* 69: 41-54, 1972.
- 41- WILLIS AL, VANE FM, KUHN DC: An endoperoxide aggregator (LASS) formed in platelets in response to thrombotic stimuli: purification, identification and unique biological significance. *Prostaglandins* 8: 453-507, 1974.
- 42- WYATT RJ, MURPHY DL: Low platelet monoamine oxidase activity and schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 2: 77-89, 1976.
- 43- YAMAGUCHI K, TOMASI L, COTE LJ: Serotonin content of platelet enriched plasma in Parkinson patients prior and during treatment with L-DOPA. *Biochem Med* 6: 210-215, 1972.
- 44- ZELLER EA, BOSHES B, ARBIT J, BIEBER M, BLONSKY ER, DOLKART M, HUPRIKAR SV: Molecular biology of neurological and psychiatric disorders. I. Effect of Parkinsonism, age, sex and L-dopa on platelet monoamine oxidase. *J Neurol Transmission* 39: 63-773, 1976.