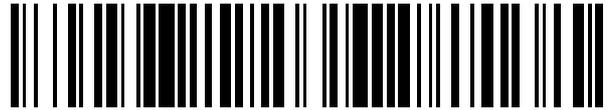


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 675**

21 Número de solicitud: 201800221

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.04.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (100.0%)
Otri. Universidad de la Laguna (Edifi. Central)
C/ Pedro Zerolo s/n Ap. 456
38200 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) ES

72 Inventor/es:

BORGES JURADO, Ricardo;
MONTENEGRO ESCUDERO, Pablo y
VILLAR MARTINEZ, Maria Dolores

54 Título: **Funcionalidad de las plaquetas para el diagnóstico muy temprano de la enfermedad de Parkinson**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson basado en detectar niveles de serotonina muy bajos en las plaquetas de los pacientes. Estudios iniciales no han encontrado niveles normales de serotonina en los pacientes, estuvieran o no tratados con L-DOPA. Igualmente, las plaquetas de los pacientes tienen alterada su capacidad para acumular la serotonina. Este cuadro parece obedecer a una deficiente capacidad de las vesículas secretoras de las plaquetas de los enfermos para acumular aminas biógenas. Dado que los mecanismos biológicos que subyacen en este problema son comunes en plaquetas y en neuronas dopaminérgicas, ello podría explicar (dada la toxicidad de la dopamina y de sus metabolitos cuando están libres en el citosol) la muerte progresiva de estas neuronas en el Parkinson. Como la afectación de los mecanismos de captación se debe a problemas en las proteínas que median su acumulación, este fallo funcional probablemente antecede en varios años a la aparición de los síntomas de la enfermedad.

La detección muy precoz de problemas en el manejo de la serotonina en plaquetas puede detectar posibles enfermos con anticipación suficiente como para instaurar medidas específicas de neuroprotección.

ES 2 752 675 A1

DESCRIPCIÓN

Funcionalidad de las plaquetas para el diagnóstico muy temprano de la enfermedad de Parkinson.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

Medicina

10 Herramientas de diagnóstico clínico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo que involucra a varios grupos neuronales del cerebro, especialmente a las neuronas dopaminérgicas del tracto nigro-estriatal. Aunque se han propuesto numerosas pruebas diagnósticas de laboratorio y por técnicas de imagen, no han demostrado fiabilidad y sigue siendo, el diagnóstico basado en síntomas clínicos, el único método reconocido. Sin embargo, la EP sólo se acompaña de síntomas cuando la pérdida neuronal alcanza al 70-80% de las neuronas nigroestriatales. En ese momento poco puede hacerse por el paciente que no sea el tratamiento sintomático y paliativo. 20 El principal fármaco utilizado es la L- DOPA, que es el precursor natural de la dopamina, pero que sólo va a funcionar durante los años en los que aun quede un número suficiente de neuronas dopaminérgicas.

25 Disponer de una herramienta diagnóstica que sea capaz de detectar la EP años, o decenas de años, antes de la aparición de los síntomas clínicos es un objetivo de primer orden, ya que permitiría iniciar terapias neuroprotectoras tempranas para retrasar (o evitar) su aparición.

30 La dopamina ha de almacenarse dentro de las vesículas secretoras (VS) para poder liberarse por un proceso denominado exocitosis y también para evitar su degradación en el citosol (citoplasma) de las neuronas. Una de las teorías sobre el origen de la EP es que parte de la dopamina permanece en el citosol de las neuronas y no es captada por las VS. La oxidación de la dopamina y de su principal metabolito (el DOPAC) genera radicales de oxígeno, muy tóxicos, que terminan matando a las neuronas dopaminérgicas (y en menor medida otras).

35 Las VS de cualquier célula secretora poseen unos mecanismos para la concentración de neurotransmisores que son comunes. Así las VS de las neuronas, de las células neuroendocrinas y de algunas células periféricas utilizan similares transportadores para concentrar aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, histamina o serotonina). 40 Curiosamente, las plaquetas y las neuronas dopaminérgicas comparten estos mecanismos (acidificación: con la V-ATPasa; transporte de ATP: con el transportador vesicular de nucleótidos -VNUT-; aminas: con el transportador vesicular de aminas, VMAT-2). No es fácil realizar estudios en humanos con neuronas, pero resulta muy sencillo trabajar con plaquetas

OBJETO DE LA INVENCIÓN

Proveer de una prueba de laboratorio que permita realizar un diagnóstico muy temprano de la enfermedad de Parkinson antes de que el paciente presente síntomas clínicos de la enfermedad.

50

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Dado que la práctica totalidad de la serotonina (también llamada 5-hidroxitriptamina ó "5-HT") se encuentra en las VS, si los mecanismos son comunes, los niveles plaquetarios de 5-HT en

los enfermos de Parkinson deberían ser bajos. También su capacidad para captar dopamina, también para retenerla, también su liberación estaría reducida. Estos problemas en la acumulación de 5-HT estarán afectados mucho tiempo antes del diagnóstico. Puede que incluso desde el momento del nacimiento.

5

Hemos:

- 1- Implementado y estandarizado la técnica de aislamiento, purificación y cuantificación de plaquetas humanas (Figura 1)
- 2- Optimizado la conservación en estado funcional óptimo durante varios días de plaquetas humanas.
- 3- Hemos implementado métodos analíticos para medir la 5-HT de plaquetas sembradas en placas multi-pocillos mediante cromatografía líquida de alta presión a fin de crear un "kit" diagnóstico de uso generalizado en el laboratorio clínico (Figura 2).
- 4- Desarrollado la técnica de la amperometría para medir la liberación de 5-HT tanto de poblaciones como de plaqueta única (Figura 2).

20

Dado que la práctica totalidad de la serotonina sanguínea (también llamada 5- hidroxitriptamina ó "5-HT") se encuentra en las VS de las plaquetas, si los mecanismos de acumulación son comunes, los niveles plaquetarios de 5-HT en los enfermos de Parkinson deberían ser bajos. También su capacidad para captar dopamina, también para retenerla y también su liberación estaría reducida. Estos problemas en la acumulación de 5-HT estarán afectados mucho tiempo antes del diagnóstico de la EP.

25

Puede que incluso desde el momento del nacimiento.

30

Hemos:

- 1- Implementado y estandarizado la técnica de aislamiento, purificación y cuantificación de plaquetas humanas específicamente pensada preservar su función secretora (Figura 1).
- 2- Optimizado la conservación de plaquetas humanas en estado funcional óptimo durante varios días.
- 3- Hemos implementado métodos analíticos para medir la 5-HT de plaquetas sembradas en placas multi-pocillos mediante cromatografía líquida de alta presión a fin de crear un "kit" diagnóstico de uso generalizado en el laboratorio clínico (Figura 2).
- 4- Desarrollado la técnica de la amperometría para medir la liberación de 5-HT tanto de poblaciones como de plaqueta única (Figura 2).

45

Resultados:

- Los niveles de 5-HT se encuentran extremadamente reducidos en pacientes con EP, tanto en los no tratados, como en los tratados con L-DOPA. Los números son tan diferentes que (en la serie medida) no hay solapamiento entre los valores de serotonina de pacientes control (sujetos presumiblemente sanos) y los enfermos de Parkinson aún sin tratar con L-DOPA (Figura 3).
- Las plaquetas de los pacientes con EP tienen reducida la captación de 5-HT (Figura 3).

50

- Las plaquetas de los pacientes con EP liberan menos 5-HT que los sujetos control en respuesta a estímulos secretagogos (Figura 4).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10 Figura 1. Protocolo optimizado para la extracción de plaquetas humanas y su posterior mantenimiento en condiciones óptimas de preservación.

Los pasos para el aislamiento y purificación son los siguientes:

- 15 1. Sacar por venopunción 2 tubos de 9 mL de sangre. Tubos Vacutainer® con EDTA. Mover dos veces por inversión y dejar reposar alrededor de 15-30 min. Temperatura ambiente.
- 20 2. Centrifugar a 200xg 20 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
3. Recoger 2/3 de la parte más alta del sobrenadante (para evitar leucocitos) con una pipeta Pasteur de plástico. Pasar a un Falcon de 15 mL.
- 25 4. Mezclar 1:1 con HEP Buffer. Añadir prostaglandina E1 (concentración 1µM final).
5. Centrifugar a 100 x g 15 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
6. Recoger sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico sin hacer burbujas y pasarlo a un Falcon de 15 mL
- 30 7. Centrifugar a 800 x g 20 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
8. Descartar el sobrenadante.
- 35 9. Lavar dos veces sin resuspender con cuidado en 1 mL de Buffer citrato.
10. Resuspender con cuidado en medio SSP++. Contar células mediante cámara Neubauer o bien análisis turbidimétrico optimizado.

40 Figura 2. - Procedimiento general optimizado para la cuantificación de serotonina en plaquetas humanas.

- 45 1. Disponer el cultivo de plaquetas en una placa de 96 pocillos de fondo cónico adaptada, de acuerdo a la figura principal.
2. Añadir las correspondientes soluciones de serotonina (5-HT), de acuerdo a la figura principal. Incubar 2h a 20-25°C a oscuras y agitación suave.
- 50 3. Enfriar a 0-4°C y centrifugar a 3200g 10min. Temperatura 4°C.
4. Descartar el sobrenadante. Lavar sin resuspender con cuidado en medio de lavado. Temperatura 4°C.
5. Centrifugar a 3200g 10min. Temperatura 4°C.

6. Descartar el sobrenadante. Resuspender gentilmente, evitando la formación de burbujas, las muestras en tampón de lisis. Temperatura 4°C.

7. Centrifugar a 3200g 5min. Temperatura 4°C.

5

Análisis de proteínas (Protein analysis).

8. Tomar 25uL de los pocillos de muestra y llevarlos a la placa de análisis de proteínas, cuidadosamente evitando burbujas. Añadir las soluciones BSA en los pocillos indicados. Temperatura 4°C.

10

9. Mezclar las soluciones A y B de revelado y añadir cuidadosamente a cada pocillo (muestra y BSA). Temperatura 4°C. Agitar ligeramente e incubar a 37°C y en oscuridad 30-45min.

15

10. Determinar la concentración de proteínas mediante lector de placas (540-590nm).

Análisis de serotonina (5-HT analysis).

11. Añadir a los 25uL de muestra restantes en la placa la solución HPLC-P cuidadosamente evitando burbujas. Congelar a -20°C 20-30min.

20

12. Descongelar a 0-4°C y centrifugar a 3200g 5min Temperatura 4°C.

13. Determinar la concentración de serotonina mediante HPLC.

25

Figura 3.- Serotonina en plaquetas humanas.

Niveles basales y tras la incubación con serotonina. Los datos están normalizados por cantidad de proteína, a fin de corregir el posible error derivado de haber analizado muestras con diferente número de plaquetas. Partiendo de los niveles basales (B) se incubaron las plaquetas, a las concentraciones indicadas en abscisas, durante dos horas. Se muestra la concentración de serotonina alcanzada en sujetos control (trazo negro) y pacientes con EP (trazo gris) para cada concentración. Las columnas muestran con mayor detalle los niveles basales de serotonina y tras la incubación con 10 µM (10^{-5} M) de 10 sujetos control (columna negra) y de 5 pacientes con EP (columna gris). Los datos muestran las medias ± error estándar. * $p < 0,05$ t-de Student.

30

35

Figura 4. La liberación de serotonina está reducida en las plaquetas provenientes de sujetos con Enfermedad de Parkinson.

40

Panel A. Esquema del sistema utilizado para la cuantificación de serotonina por poblaciones de ≈10 millones de plaquetas que se empaquetan en una cámara de perfusión en línea con un detector electroquímico con un potencial fijado a +700 mV. A la derecha se expone un registro típico de la liberación de serotonina total.

45

Panel B. Sistema de amperometría con micro electrodos que permite la detección de la liberación de un solo gránulo secretor de una plaqueta humana. A la derecha se muestra una 'espiga' típica. Una plaqueta libera sus 5-12 gránulos en muy pocos segundos. Los tamaños de las espigas (área bajo la curva) nos indicará la cantidad total de serotonina y, al ser un fenómeno todo-o-nada, el contenido de serotonina de cada uno. Las dos aproximaciones técnicas muestran una reducción del contenido y de la liberación de serotonina.

50

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

En las figuras 2 y 3 se expone el protocolo de aislamiento y de mantenimiento de las plaquetas.

- 5 Las composiciones de las soluciones a utilizar se exponen a continuación:
- HEP Buffer (NaCl 140.0mM, KCl 2.7mM, EGTA 5.0mM, HEPES 3.8mM, pH 7.4 NaOH).
- 10 Buffer citrato (NaCl 150.0mM, EDTA 1.0mM, D-Glucosa 50.0mM, Citrato-Na⁺ 10.0mM, pH 7.4 NaOH).
- SSP++ (NaCl 69.3mM, KCl 5.0mM, MgCl₂ 1.5mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 28.2mM, Citrato-Na⁺ 10.8mM, Acetato-Na⁺ 32.5mM, D-Glucosa 5.0mM, penicilina - estreptomicina 100u/mL, pH 7.2 NaOH).
- 15 Soluciones de serotonina (NaCl 69.3mM, KCl 5.0mM, MgCl₂ 1.5mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 28.2mM, Citrato-Na⁺ 10.8mM, Acetato-Na⁺ 32.5mM, D-Glucosa 5.0mM, Ascórbico 200uM, 5-HT 0-1000uM, pH 7.2 NaOH).
- 20 Medio de lavado (NaCl 69.3mM, KCl 5.0mM, MgCl₂ 1.5mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 28.2mM, Citrato-Na⁺ 10.8mM, Acetato-Na⁺ 32.5mM, D-Glucosa 5.0mM, pH 7.2 NaOH).
- Tampón de tisis (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, TritonX 1%, pH 7.4 NaOH).
- 25 Soluciones BSA (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, TritonX 1%, BSA 0- 2mg pH 7.4 NaOH).
- Solución A (Acidobicinconinico).
- 30 Solución B (CuSO₄ 4% g/L).
- Solución HPLC-P. (PCA 0.45N, IS 225nM).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico caracterizado por el uso de la concentración basal de serotonina en las plaquetas humanas como un índice predictivo para el diagnóstico de la enfermedad de parkinson antes de que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad
- 10 2. Método de diagnóstico según reivindicación 1 donde la cuantificación de serotonina se determina por HPLC en placas de 96 pocillos mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas.
- 15 3. Método de diagnóstico según reivindicación 1 donde la cuantificación de serotonina se determina por amperometría en poblaciones o con amperometría con micro- electrodos.
- 15 4. Método de diagnóstico según reivindicación 1 donde el protocolo de extracción y purificación de las plaquetas comprende los siguientes pasos:
 - 20 1. Sacar por venopunción 2 tubos de 9 mL de sangre. Tubos Vacutainer® con EDTA. Mover dos veces por inversión y dejar reposar alrededor de 15-30 min. Temperatura ambiente.
 - 20 2. Centrifugar a 200xg 20 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
 - 25 3. Recoger 2/3 de la parte más alta del sobrenadante (para evitar leucocitos) con una pipeta Pasteur de plástico. Pasar a un Falcon de 15 mL
 - 25 4. Mezclar 1:1 con HEP Buffer. Añadir prostaglandina E1 (concentración 1µM final).
 - 30 5. Centrifugar a 100 x g 15 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
 - 30 6. Recoger sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico sin hacer burbujas y pasarlo a un Falcon de 15 mL.
 - 35 7. Centrifugar a 800 x g 20 min. Sin freno. Temperatura 20°C.
 - 35 8. Descartar el sobrenadante.
 - 40 9. Lavar dos veces sin resuspender con cuidado en 1 mL de Buffer citrato.
 - 40 10. Resuspender con cuidado en medio SSP++. Contar células mediante cámara Neubauer o bien análisis turbidimétrico optimizado.
- 45 5. Método de diagnóstico según reivindicación 1 donde el protocolo para la cuantificación de serotonina comprende los siguientes pasos:
 - 45 1. Disponer el cultivo de plaquetas en una placa de 96 pocillos de fondo cónico adaptada, de acuerdo a la figura principal
 - 50 2. Añadir las correspondientes soluciones de serotonina (5-HT), de acuerdo a la figura principal. Incubar 2h a 20-25°C a oscuras y agitación suave.
 - 50 3. Enfriar a 0-4°C y centrifugar a 3200g 10min. Temperatura 4°C.
 4. Descartar el sobrenadante. Lavar sin resuspender con cuidado en medio de lavado. Temperatura 4°C.

5. Centrifugar a 3200g 10min. Temperatura 4°C.
- 5 6. Descartar el sobrenadante. Resuspender gentilmente, evitando la formación de burbujas, las muestras en tampón de lisis. Temperatura 4°C.
7. Centrifugar a 3200g 5min. Temperatura 4°C.
8. Tomar 25uL de los pocillos de muestra y llevarlos a la placa de análisis de proteínas, cuidadosamente evitando burbujas. Añadir las soluciones BSA en los pocillos indicados. 10 Temperatura 4°C.
9. Mezclar las soluciones A y B de revelado y añadir cuidadosamente a cada pocillo (muestra y BSA). Temperatura 4°C. Agitar ligeramente e incubar a 37°C y en oscuridad 30-45min. 15
10. Determinar la concentración de proteínas mediante lector de placas (540-590nm, Protein analysis).
11. Añadir a los 25uL de muestra restantes en la placa la solución HPLC-P. 20 cuidadosamente evitando burbujas. Congelar a -20°C 20-30min.
12. Descongelar a 0-4°C y centrifugar a 3200g 5min. Temperatura 4°C.
13. Determinar la concentración de serotonina mediante HPLC (5-HT analysis). 25

Figura 1

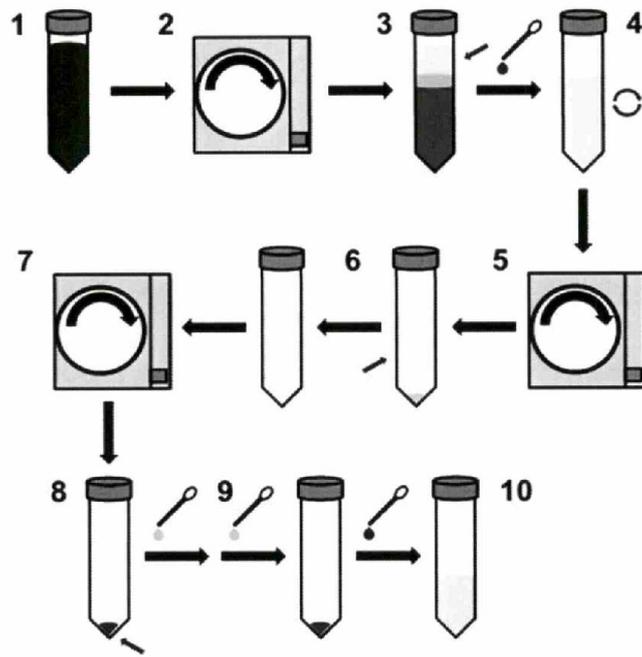


Figura 2

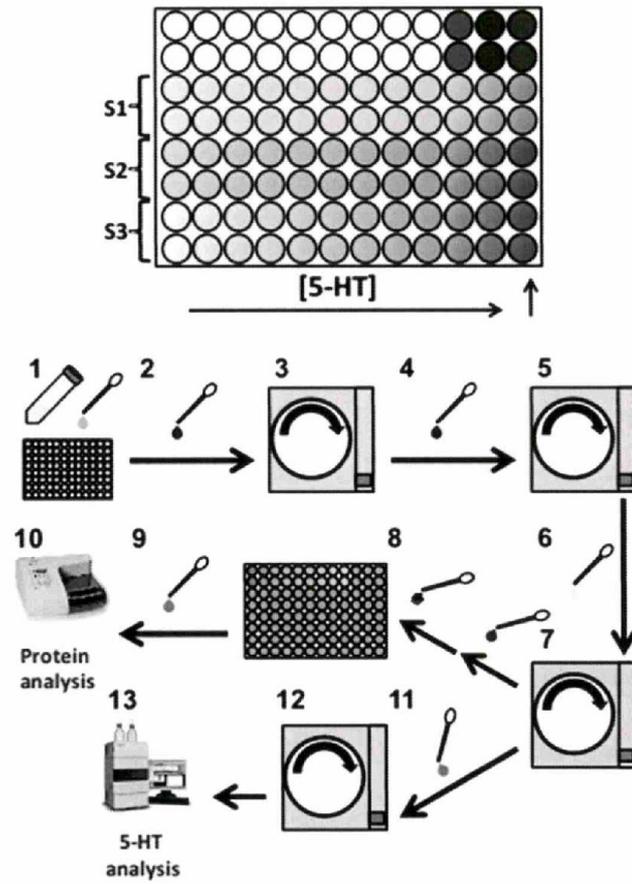


Figura 3

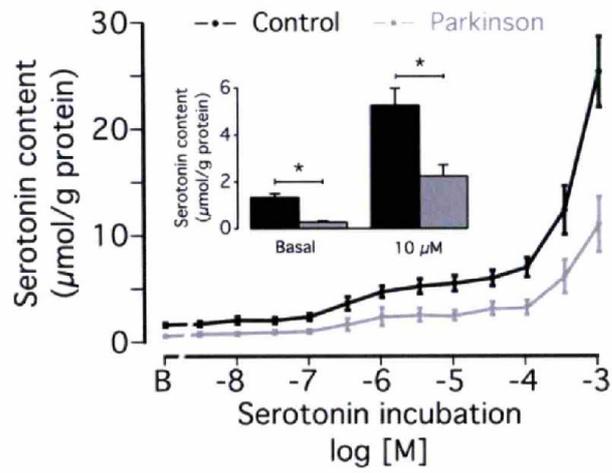
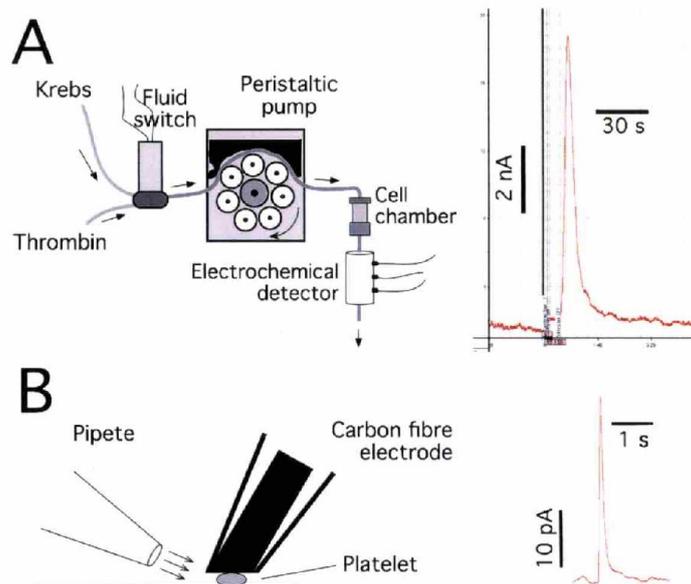


Figura 4





- ②① N.º solicitud: 201800221
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZUO LI-JUN <i>et al.</i> Serotonergic dysfunctions and abnormal iron metabolism: Relevant to mental fatigue of Parkinson disease. Scientific Reports DEC 21 2016. , 21/12/2016, Vol. 6, páginas 1-9 Article No.: 19, ISSN 2045-2322(print) ISSN 2045-2322(electronic), <DOI: doi:10.1038/s41598-016-0018-z> página 3, primer y quinto párrafo; página 6; resumen.	1-5
A	JOLANTA DORSZEWSKA <i>et al.</i> Serotonin in Neurological diseases, 2017, páginas 219-240 Recuperado de Internet <URL: https://www.intechopen.com/books/serotonin-a-chemical-messenger-between-all-types-of-living-cells/serotonin-in-neurological-diseases >, <DOI: DOI: 10.5772/intechopen.69035> página 220, primer y tercer párrafos; página 224; resumen.	1-5
A	LLINÁS SERGIO G <i>et al.</i> Platelet serotonin concentration and clinical status in alcohol withdrawal syndrome, preliminary results. MEDICC review United States Jan 2014, Vol. 16, páginas 37 - 42, ISSN 1527-3172 (Electronic), <DOI: pubmed: 24487674> página 37; página 38, columna derecha, penúltimo y último párrafo.	1-5
A	GOUBAU CHRISTOPHE <i>et al.</i> The contribution of platelet studies to the understanding of disease mechanisms in complex and monogenetic neurological disorders. Developmental Medicine & Child Neurology AUG 2014, Vol. 56, páginas 724-731, ISSN 0012-1622(print) ISSN 1469-8749(electronic), <DOI: doi:10.1111/dmcn.12421> página 724.	1-5

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.11.2018

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/74 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET