

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

## PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**04.10.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**06.04.2020**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**01.07.2021**

Fecha de concesión:

**25.10.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**02.11.2021**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (100.0%)  
Otri. Universidad de la Laguna (Edifi. Central).  
C/ Pedro Zero 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: **Método de laboratorio para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson**

57 Resumen:

Método de laboratorio para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson. La invención describe un método de diagnóstico de la enfermedad de Parkinson caracterizado por el uso de la concentración basal de serotonina en las plaquetas humanas como un índice predictivo para el diagnóstico de la enfermedad antes de que aparezcan los primeros síntomas, indicando bajas concentraciones de dicha serotonina la presencia de la enfermedad.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 752 675 B2

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

Medicina. Herramientas de diagnóstico clínico.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 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  
15 ese momento poco puede hacerse por el paciente que no sea el tratamiento sintomático y paliativo. 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.

20 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.

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  
25 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).

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  
30 neuroendocrinas y de algunas células periféricas utilizan similares transportadores para concentrar aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, histamina o serotonina). 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  
35 realizar estudios en humanos con neuronas, pero resulta muy sencillo trabajar con plaquetas.

**OBJETO DE LA INVENCION**

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.

5

**EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

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.

10

La invención consiste en un método de diagnóstico que comprende el aislamiento, purificación y cuantificación plaquetas humanas (Figura 1), conservándose éstas en estado funcional óptimo durante varios días.

15

Se han 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). Por último, se ha desarrollado la técnica de la amperometría para medir la liberación de 5-HT tanto de poblaciones como de plaqueta única.

20

**MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

En una realización de la invención el método de diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson comienza con el aislamiento y purificación de las plaquetas según el protocolo descrito en la figura 1. Se utilizan 2 tubos de 9 mL de sangre en tubos Vacutainer® con EDTA, se mueve dos veces por inversión y se deja reposar alrededor de 15-30 min a temperatura ambiente (1). Se centrifuga a 200xg 20 min sin freno a una temperatura de 20°C (2). Se Recogen 2/3 de la parte más alta del sobrenadante (para evitar leucocitos) con una pipeta Pasteur de plástico y se pasan a un tubo tipo Falcon de 15 mL (3). Se mezcla 1:1 con HEP Buffer y se añade prostaglandina E1 (a concentración final de 1µM) (4). Se centrifuga a 100 x g durante 15 min sin freno a temperatura 20°C (5). Se recoge el sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico sin hacer burbujas y se pasa a un tubo tipo Falcon de 15 mL (6). Se centrifuga a 800 x g 20 min sin freno y a temperatura de 20°C (7). Se descarta el sobrenadante (8). Se lava dos veces, sin resuspender, con cuidado, en 1 mL de Buffer citrato (9). Finalmente, se resuspende con cuidado en medio SSP++ y se cuentan las células mediante cámara Neubauer o bien mediante análisis turbidimétrico optimizado (10).

30

35

Para la cuantificación de la serotonina en las plaquetas se dispone el cultivo de plaquetas en una placa de 96 pocillos de fondo cónico adaptada, de acuerdo a la figura principal (11). Se añaden las correspondientes soluciones de serotonina (5-HT) y se incuban durante 2h a 20-25°C a oscuras y en agitación suave (12). Se enfría a 0-4°C y se centrifuga a 3200 x g durante 10min a una temperatura de 4°C (13). Posteriormente se descarta el sobrenadante y se lava sin resuspender con cuidado en medio de lavado a temperatura de 4°C (14). Posteriormente se centrifuga a 3200g durante 10min a temperatura de 4°C (15). Se descarta el sobrenadante, resuspendiendo gentilmente evitando la formación de burbujas, las muestras en tampón de lisis a temperatura de 4°C (16). Se vuelve a centrifugar a 3200g durante 5 min a temperatura 4°C (17).

Para el análisis de proteínas se toman 25 uL de los pocillos de muestra y se llevan a la placa de análisis de proteínas, cuidadosamente evitando burbujas y se añaden las soluciones BSA en los pocillos indicados a temperatura 4°C (18). Posteriormente se mezclan las soluciones A y B de revelado y se añaden cuidadosamente a cada pocillo (muestra y BSA) a la temperatura de 4°C, se agita ligeramente e incuba a 37°C y en oscuridad durante 30-45min (19). La determinación de la concentración de proteínas se realiza mediante lector de placas entre 540-590nm (20).

Para el análisis de serotonina se añade, cuidadosamente evitando burbujas, a los 25uL de muestra restantes en la placa, la solución HPLC-P y se congela a -20°C durante 20-30min (21). Posteriormente se descongela a 0-4°C y se centrifuga a 3200g durante 5min a la temperatura de 4°C (22). Finalmente se determina la concentración de serotonina mediante HPLC (23).

La liberación de serotonina está reducida en las plaquetas provenientes de sujetos con enfermedad de Parkinson, concentraciones de serotonina plaquetaria por debajo de 0,5 µmol/g de proteína indicarían la presencia de la enfermedad, tal y como se refleja en la figura 3A, donde se muestra la concentración de serotonina alcanzada en sujetos control (trazo negro) y pacientes con EP (trazo gris), tanto a nivel basal como después de incubación con serotonina a 10 µmol/g. 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 se incuban las plaquetas, a las concentraciones indicadas en abscisas, durante dos horas. Las columnas (figura 3B) 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.

Las composiciones de las soluciones a utilizar en esta realización se exponen a continuación:

**HEP Buffer** (NaCl 140 mM, KCl 2,7mM, EGTA 5 mM, HEPES 3,8 mM, pH 7,4 NaOH).

**Buffer citrato** (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, D-Glucosa 50 mM, Citrato- $\text{Na}^+$  10 mM, pH 7,4 NaOH).

5 **SSP++** (NaCl 69,3mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  28,2 mM, Citrato- $\text{Na}^+$  10,8 mM, Acetato- $\text{Na}^+$  32,5 mM, D-Glucosa 5 mM, penicilina – estreptomicina 100 uu/mL , pH 7,2 NaOH).

**Soluciones de serotonina** (NaCl 69,3mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  28,2 mM, Citrato- $\text{Na}^+$  1,8 mM, Acetato- $\text{Na}^+$  32,5mM, D-Glucosa 5 mM, Ascórbico 200  $\mu\text{M}$ , 5-HT 0-1000  $\mu\text{M}$ , pH 7,2 NaOH).

**Medio de lavado** (NaCl 69,3 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  28,2 mM, Citrato- $\text{Na}^+$  10,8 mM, Acetato- $\text{Na}^+$  32,5 mM, D-Glucosa 5 mM, pH 7,2 NaOH).

**Tampón de lisis** (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, Triton-X 100 1%, pH 7.4 NaOH).

**Soluciones BSA** (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, Triton X 100 1%, BSA 0-2 mg, pH 7,4 NaOH).

**Solución A** (Acidobicinconínico).

**Solución B** ( $\text{CuSO}_4$  4% g/L).

**Solución HPLC-P.** (PCA 0,45N, IS 225nM).

20 En otra realización de la invención la cuantificación de la serotonina se determina por detección electroquímica utilizando un sistema para la cuantificación de serotonina por poblaciones de  $\approx 10$  millones de plaquetas que se empaquetan en una cámara de perfusión en línea con un detector electroquímico con un potencial fijado a +700 mV (figura 4A).

25 En otra realización de la invención la cuantificación de la serotonina se determina por amperometría (figura 5A). El sistema de amperometría con micro electrodos permite la detección de la liberación de un solo gránulo secretor de una plaqueta humana. Una plaqueta libera sus 5-12 gránulos en muy pocos segundos. La figura 5B muestra una ‘espiga’ típica. 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 tres aproximaciones técnicas muestran una reducción del contenido y de la liberación de serotonina.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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:

### **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:

- 1- Procesado de la muestra que contiene las plaquetas (1)
- 2- Centrifugación (2)
- 3- Extracción de sobrenadante (3)
- 4- Mezclado (4)
- 5- Centrifugación (5)
- 6- Extracción de sobrenadante (6)
- 7- Centrifugación (7)
- 8- Descartar el sobrenadante (8)
- 9- Lavado (9)
- 10- Resuspensión y conteo (10)

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

- 1- Disponer el cultivo de plaquetas en una placa de 96 pocillos de fondo cónico adaptada (11)
  - 2- Añadir las correspondientes soluciones de serotonina (5-HT) e incubar (12)
  - 3- Enfriar y centrifugar (13)
  - 4- Descartar el sobrenadante y lavar sin resuspender (14)
  - 5- Centrifugar (15)
  - 6- Descartar el sobrenadante y resuspender (16)
  - 7- Centrifugar (17)
  - Análisis de proteínas**
  - 8- Tomar 25uL de los pocillos de muestra y llevarlos a la placa de análisis de proteínas, añadir las soluciones BSA en los pocillos indicados (18)
  - 9- Mezclar las soluciones A y B de revelado y añadir cuidadosamente a cada pocillo (muestra y BSA) agitar ligeramente e incubar (19)
  - 10- Determinar la concentración de proteínas mediante lector de placas (540-590nm) (20)
- Análisis de serotonina (5-HT analysis).

11- Añadir a los 25uL de muestra restantes en la placa la solución HPLC-P y (21)

12- Descongelar y centrifugar (22)

13- Determinar la concentración de serotonina mediante HPLC (23)

**Figura 3. Niveles basales y tras la incubación con serotonina en plaquetas humanas.** La

5 figura 3A muestra la evolución de la concentración de serotonina. La escala en ordenadas se expresa el contenido en serotonina de las plaquetas humanas en micromoles/g de proteína total. En abscisas la concentración de serotonina utilizada en la incubación (en  $-\log[M]$ ). 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  
10 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. La figura 3B muestra con mayor detalle los niveles basales de serotonina y tras la incubación con  $10 \mu\text{M}$  ( $10^{-5} \text{ M}$ ) de 10 sujetos control (columna negra) y de 5 pacientes con EP (columna gris). La escala en  
15 ordenadas se expresa el contenido en serotonina de las plaquetas humanas en micromoles/g de proteína total. Los datos muestran las medias  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  t-de Student.

**Figura 4. Sistema utilizado para la cuantificación de serotonina por detección electroquímica.** En la figura 4A se muestra un esquema del sistema utilizado para la

20 cuantificación de la serotonina. El sistema está formado por con una electroválvula para alternar solución salina con el estímulo (25), una bomba peristáltica (26), una cámara de perfusión donde se alojan las plaquetas (27) y una célula electroquímica de medición (28). Este sistema cuantifica la serotonina en poblaciones de  $\approx 10$  millones de plaquetas que se empaquetan en una cámara de perfusión en línea con un detector electroquímico (28) con un  
25 potencial fijado a  $+700 \text{ mV}$ . La figura 4B muestra un registro típico de la liberación de serotonina total.

**Figura 5. Sistema utilizado para la cuantificación de serotonina por amperometría.**

La figura 5A muestra el sistema de amperometría con micro electrodos que comprende una  
30 micropipeta para la administración por presión del secretagogo (trombina o ionóforos del calcio) (29) y un microelectrodo de carbón (30) que es el lugar donde se mide la secreción de serotonina por amperometría. Este sistema permite la detección de la liberación de un solo gránulo secretor de una plaqueta humana (31). La figura 5B muestra una 'espiga' típica. Una plaqueta libera sus 5-12 gránulos en muy pocos segundos. Los tamaños de las espigas (área  
35 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.

## REIVINDICACIONES

1. Método de laboratorio para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson caracterizado por una etapa de extracción y purificación de las plaquetas y otra de  
5 separación y cuantificación de la concentración basal de serotonina determinada mediante HPLC, detección electroquímica o ELISA en plaquetas humanas como un índice predictivo para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson, donde concentraciones de serotonina plaquetaria por debajo de 0.5  $\mu\text{mol/g}$  determinadas mediante HPLC indicaría la presencia de la enfermedad.  
10
2. Método de laboratorio según reivindicación 1 donde el protocolo de extracción y purificación de las plaquetas comprende los siguientes pasos:
  - 1- Procesado de la muestra que contiene las plaquetas, mover por inversión y dejar reposar a temperatura ambiente.
  - 15 2- Centrifugar a temperatura 20°C.
  - 3- Recoger 2/3 de la parte más alta del sobrenadante.
  - 4- Mezclar 1:1 con HEP Buffer. Añadir prostaglandina E1 (concentración 1 $\mu\text{M}$  final).
  - 5- Centrifugar a 20°C.
  - 20 6- Recoger sobrenadante
  - 7- Centrifugar a 20°C.
  - 8- Descartar el sobrenadante.
  - 9- Lavar dos veces sin resuspender en 1 mL de Buffer citrato.
  - 10- Resuspender en medio SSP++. Contar células mediante cámara
  - 25 Neubauer o bien análisis turbidimétrico optimizado.
3. Método de diagnóstico según reivindicación 1 donde el protocolo para la cuantificación de serotonina comprende los siguientes pasos:
  - 1- Disponer el cultivo de plaquetas en una placa.
  - 30 2- Añadir las correspondientes soluciones de serotonina (5-HT) e incubar 2h a 20-25°C a oscuras y agitación suave.
  - 3- Enfriar a 0-4°C y centrifugar a 4°C.
  - 4- Descartar el sobrenadante. Lavar sin resuspender en medio de lavado a 4°C.
  - 5- Centrifugar a 4°C.
  - 35 6- Descartar el sobrenadante. Resuspender en tampón de lisis a 4°C.
  - 7- Centrifugar a 4°C.

- 8- Tomar 25uL de los pocillos de muestra y llevarlos a la placa de análisis de proteínas. Añadir las soluciones BSA en los pocillos indicados. 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.
- 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. Congelar a -20°C 20-30min.
- 12- Descongelar a 0-4°C y centrifugar a 4°C.
- 13- Determinar la concentración de serotonina mediante HPLC (5-HT analysis).

Figura 1

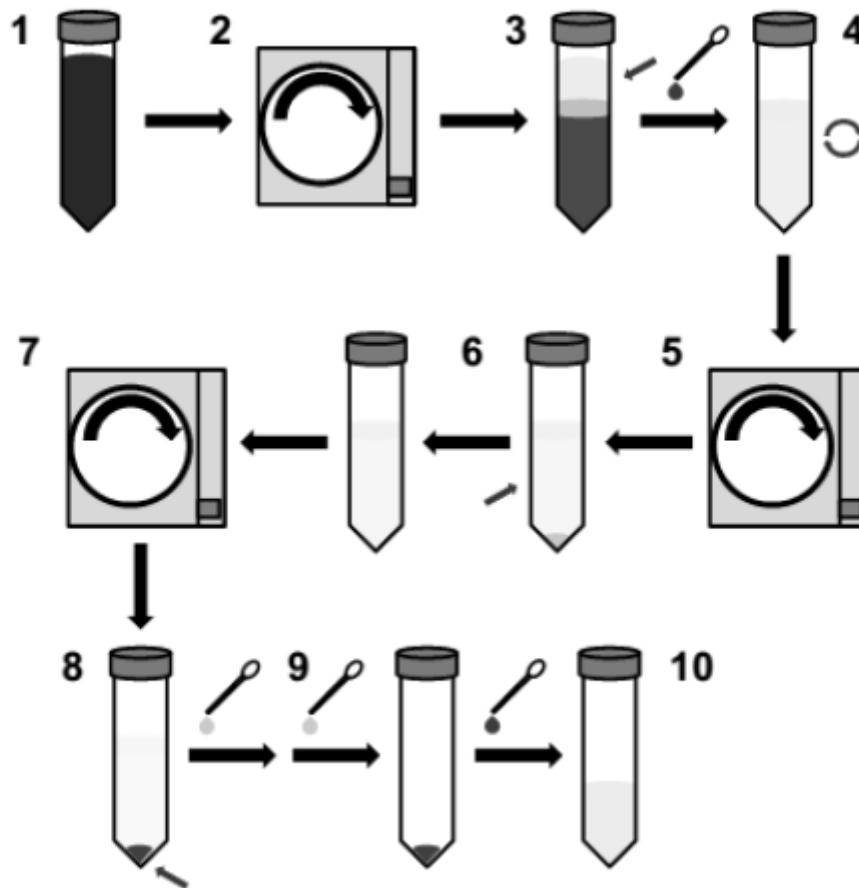
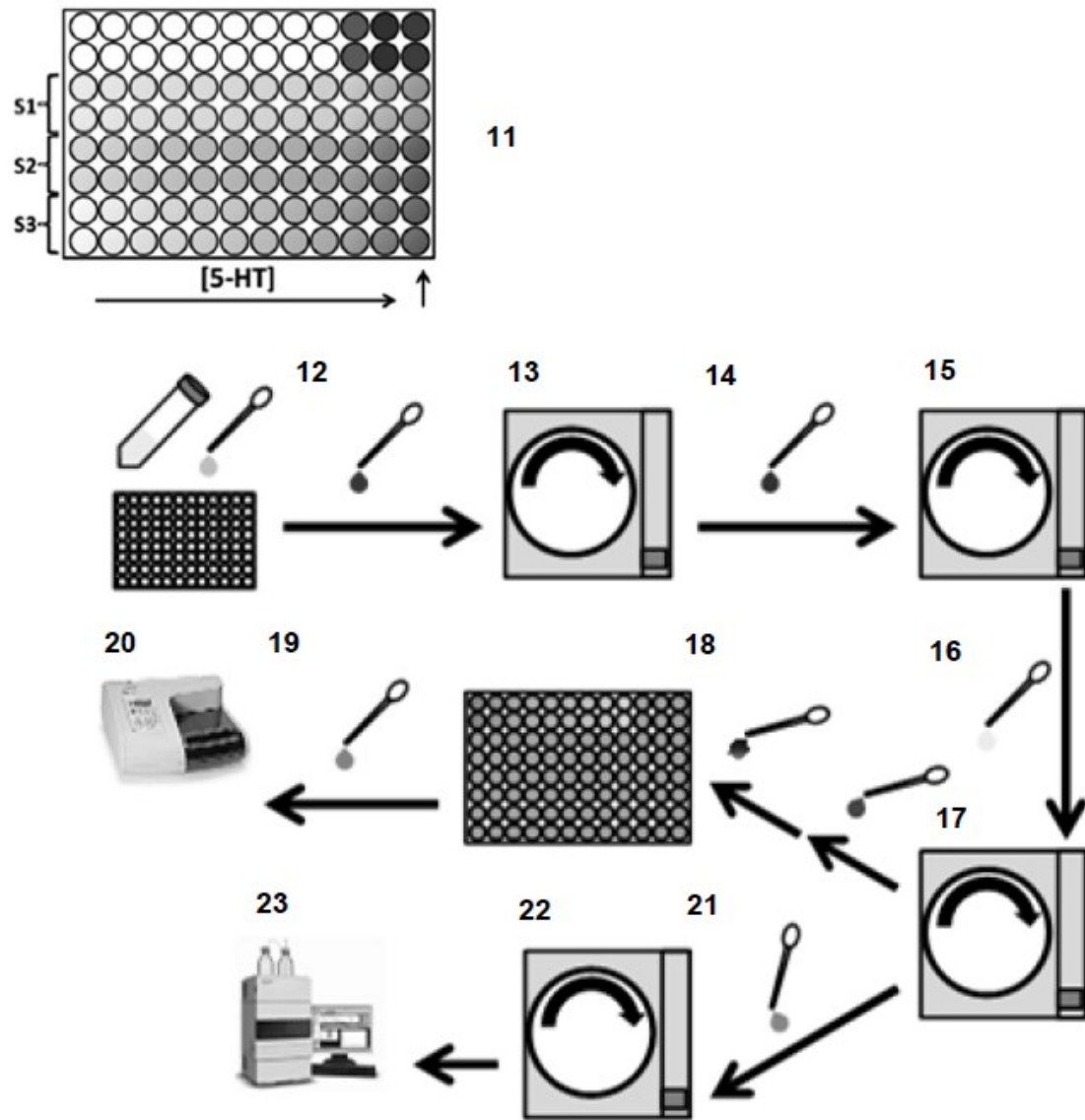
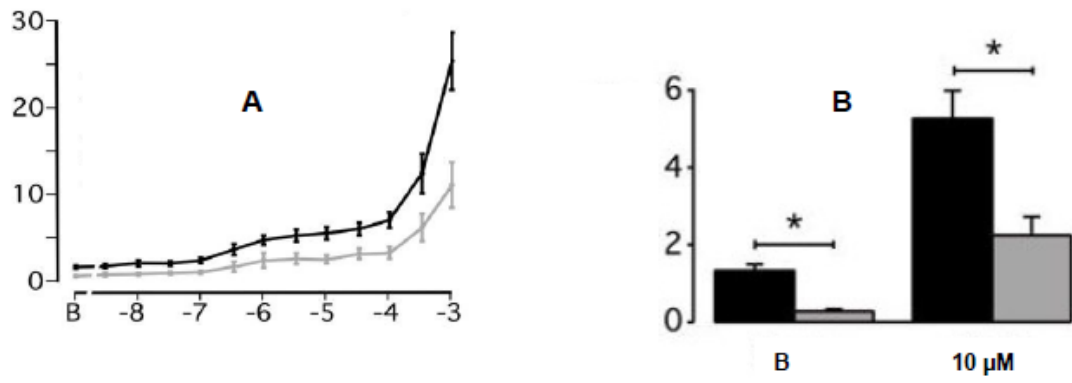


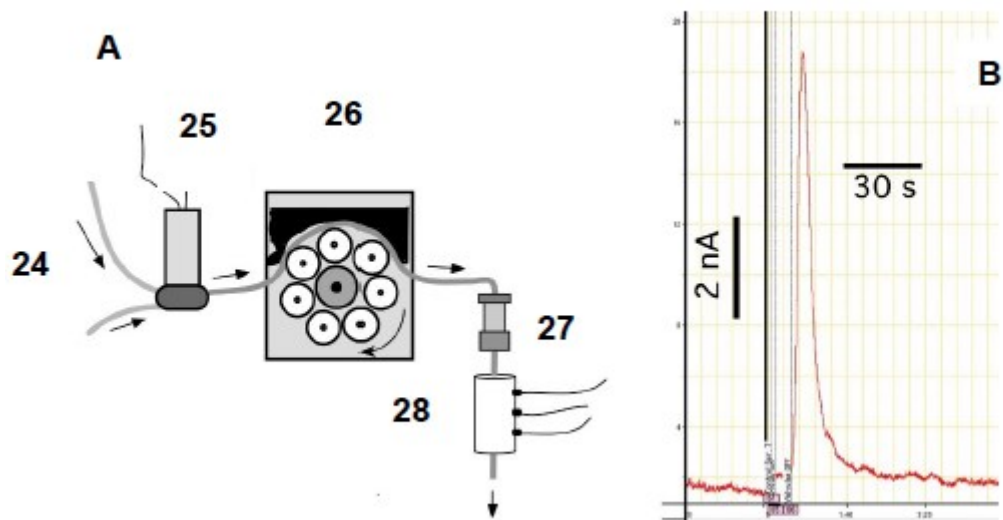
Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

