



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

INHIBICIÓN DE LA SECRECIÓN DEL PÉPTIDO $A\beta_{40}$
PLAQUETARIO POR ACCIÓN DE LA PROSTAGLANDINA E-1.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: JORDAN NORAMBUENA CONCHA
PROFESOR GUÍA: DR. TM. MARCELO ALARCÓN LOZANO

TALCA-CHILE
2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

INDICE

1. RESUMEN. INTRODUCCION	6
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
3.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	8
3.1.1 ETIOLOGIA	9
3.1.2 EPIDEMIOLOGIA	10
3.1.3 FISIOPATOGENIA DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	11
3.2 PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE (APP) Y PROCESAMIENTO DE PEPTIDO A. 13	
3.3 PLAQUETAS Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	15
3.4 CALPAINA Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	20
3.5 PROSTAGLANDINA E1 (PGE-1) EN PLAQUETAS	25
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 TOMA DE MUESTRA.	31
5.2 OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP)	31
5.3 AGREGACIÓN PLAQUETARIA	32
5.4 DOT BLOT	34
5.4.1. LAVADO DE PLAQUETAS	34
5.4.2 DISPOSICION DE MUESTRA (GOTA)	35
5.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	37
5.6 CUANTIFICACION DE LA SECRECIÓN DEL PÉPTIDO AB₄₀	38
6. RESULTADOS	40
6.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA	40
6.2 DOT BLOT	42
6.3 MEDICIÓN ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.	43
7. DISCUSION	46
8. CONCLUSIÓN	50
9. REFERENCIAS	52

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CAMBIOS COMPARATIVOS EN NEURONAS SANAS Y NEURONAS ANORMALES IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LA EA.....	8
FIGURA 2. HIPÓTESIS DE CASCADA AMILOIDE.	11
FIGURA 3. ANORMALIDADES EN LAS PLAQUETAS DE EA.	16
FIGURA 4. ACTIVIDAD DE LA CALPAÍNA DESEMPEÑA UN PAPEL IMPORTANTE EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	20
FIGURA 5. ESQUEMA PROPUESTO DE DESREGULACIÓN DE CREB.....	22
FIGURA 6. PAPEL DE LA CALPAÍNA EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA FISIOLÓGICA..	23
FIGURA 7. ESTRUCTURA DE PROSTAGLANDINA E1	25
FIGURA 8. RECEPTORES DE PGE1 Y PGE2.....	27
FIGURA 9. CENTRIFUGA EPPENDORF.....	31
FIGURA 10. CONTADOR HEMATOLÓGICO.....	31
FIGURA 11. AGREGOMETRO CRONO-LOG 560.....	32
FIGURA 12. GRAFICA DE CUADROS DE TRABAJO EN MEMBRANA PVDF.....	34
FIGURA 13. MEMBRANA PVDF DIMENSIONADA EN CUADROS 1CM X 1CM	34
FIGURA 14. RECIPIENTES CON METANOL, AGUA DESTILADA Y BUFFER DE LAVADO.....	35
FIGURA 15. HUMEDAD DE MEMBRANA PVDF Y FORMA DE GOTA (MUESTRA).	¡Error!
Marcador no definido.	
FIGURA 16. CITÓMETRO DE FLUJO BD ACCURI C6.....	36
FIGURA 17. CONTROL DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA	40
FIGURA 18. INHIBICIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.	¡Error! Marcador no definido.
FIGURA 19. EXPRESIÓN DE PÉPTIDO AB40 EN DOT BLOT	41
FIGURA 20. EXPRESIÓN DE PÉPTIDO AB40 CON DIFERENTES CONDICIONES.....	42
FIGURA 21. CONTROLES CITOMETRÍA DE FLUJO.....	43
FIGURA 22. EXPRESION DE P-SELECTINA	44

1. RESUMEN

En la enfermedad de Alzheimer, se producen placas seniles compuestas por la proteína Tau fosforilada y por péptidos A β , esta última se ha confirmado que las plaquetas al activarse mediante agonistas como trombina, secretan péptido A β ₄₀ a circulación sanguínea y que puede cruzar la barrera hematoencefálica, depositándose como placas cerebrovasculares y contribuir al desarrollo de esta patología. Al ser una enfermedad de relevancia en la salud pública, la búsqueda mecanismos moleculares de inhibición de este proceso son relevantes para el desarrollo de dianas farmacológicas, el objetivo de este trabajo fue demostrar que la Prostaglandina E1 es capaz de inhibir la secreción plaquetaria del péptido A β ₄₀ asociada a la activación de la calpaína inducida por TRAP-6.

Mediante ensayos de agregación plaquetaria e inmunofluorescencia, investigamos la inhibición en la secreción del péptido A β ₄₀ asociada a la activación de la calpaína inducida con agonista TRAP-6 (10 μ M), con el objetivo de demostrar la acción de Prostaglandina E1, en donde se produjo un descenso de la agregación plaquetaria desde 82% a un 3%. Además hubo reducción en la expresión de la secreción del péptido A β respecto al control incubado con PGE-1.

Finalmente, con los resultados obtenidos, la Prostaglandina E-1 inhibe la síntesis del péptido A β ₄₀ por parte de las plaquetas, y así evitar la formación de placas seniles, características de la enfermedad de Alzheimer

2. INTRODUCCION

La demencia es un problema de alto impacto en la salud pública producto del aumento de la incidencia y gran costo que significa a nivel individual y social, ya que afecta a la población adulta mayor. En Chile, más del 10% de la población la constituyen los adultos mayores y se sabe que actualmente representa el tercer país más envejecido de Latinoamérica, más de 300 mil personas han pasado la barrera de los 80 años, estimándose que, la demencia y el Alzheimer es la cuarta enfermedad que afecta a los años de vida saludables perdidos (AVISA) en este grupo de edad. Como dato, 200.000 personas presentan demencia y se proyecta que esta prevalencia se triplicara para el año 2050 (1). De este modo la enfermedad de Alzheimer representa la principal causa de demencia en este grupo etario, volviéndose un importante problema a nivel de salud pública.

Las plaquetas son fragmentos anucleados que participan en la hemostasia. Estudios recientes han mostrado la activación plaquetaria contribuyen en la liberación de péptidos y su posterior acumulación. Por lo tanto, las plaquetas podrían ser relevantes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, contribuyendo a la inflamación y destrucción del tejido neuronal.

Por otro lado, las plaquetas activadas mediante señalización intracelular de calpaína secretan y procesan la proteína precursora amiloide (APP), glicoproteína de membrana, que se escinde de manera anómala y finalmente secreta el péptido $A\beta_{40}$. Este péptido $A\beta_{40}$ va a ir a depositarse a los vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre del cerebro pudiendo llevar a dos procesos, uno de ellos es una hemorragia cerebral y por otra parte puede provocar una isquemia cerebral. Esto recibe el nombre de angiopatía amiloide cerebral la cual está presente en hasta el 80% de los casos con enfermedad de Alzheimer. Por lo cual la búsqueda de mecanismos moleculares que permitan inhibir esta secreción es primordial para la obtención de un producto que pueda detener el desarrollo de la

enfermedad de Alzheimer. Se piensa que la Prostaglandina E-1, un compuesto .antiplaquetario, pueda reducir la secreción plaquetaria in vitro del péptido $A\beta_{40}$ inducida por un agonista, TRAP-6, así disminuir la formación de placa amiloides en el cerebro, y contribuir hacia una alternativa para la prevención de enfermedades neurodegenerativa

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las plaquetas son fragmentos anucleados provenientes de la fragmentación de megacariocitos, su función en la hemostasia y trombosis ha sido reconocido por mucho tiempo (2). Múltiples estudios sugieren que, a pesar de su valor rol fisiológico, la activación plaquetaria desregulada desempeña un papel central en la formación de trombos patológicos, que es un factor de riesgo importante en la enfermedad de Alzheimer (EA)(3). Las lesiones características responsables del deterioro mental desarrollado en los pacientes con el Alzheimer, corresponden a la formación de placas amiloides que se acumulan en el espacio extracelular del tejido cerebral; además de la angiopatía amiloide que puede ocurrir en los vasos sanguíneos cerebrales (4). En ambos casos la formación y precipitación del péptido amiloide β ($A\beta$), un fragmento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), juega un papel fundamental en el desarrollo de dichas lesiones. Las plaquetas contienen APP y toda la maquinaria necesaria para generar péptido $A\beta$, lo que puede contribuir a la deposición amiloide perivascular visto en la EA (5). Se ha relacionado la calpaína como moduladora en el procesamiento y secreción del péptido $A\beta$ plaquetario y su efecto en el desarrollo de la EA (6). Para experimentar la disminución de la secreción de este péptido por acción de las plaquetas, se ocupó el hormona sintética denominada Prostaglandina E1, potente inhibidor de la agregación plaquetaria, para luego cuantificar la liberación del péptido $A\beta$ plaquetario y evidenciar su reducción, producto de mecanismos moleculares que se explicarán en este trabajo experimental.

3.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA se define como un trastorno neurodegenerativo que causa un deterioro progresivo de la memoria y la cognición. La EA es un trastorno cerebral grave, si bien su etiología no está del todo dilucidada, la enfermedad muestra depósitos severos de β -amiloide en el

cerebro (placas) y en los vasos (angiopatía amiloide cerebral, CAA) (7). Dos proteínas están asociadas a estas lesiones, gracias a su capacidad de formar agregados en el cerebro (Figura 1): la proteína Tau, que forma ovillos neurofibrilares intracelulares; además de formas insolubles del péptido A β que se ensambla en placas extracelulares (8). La EA se caracteriza por un inicio tardío típicamente después de los 65 años.

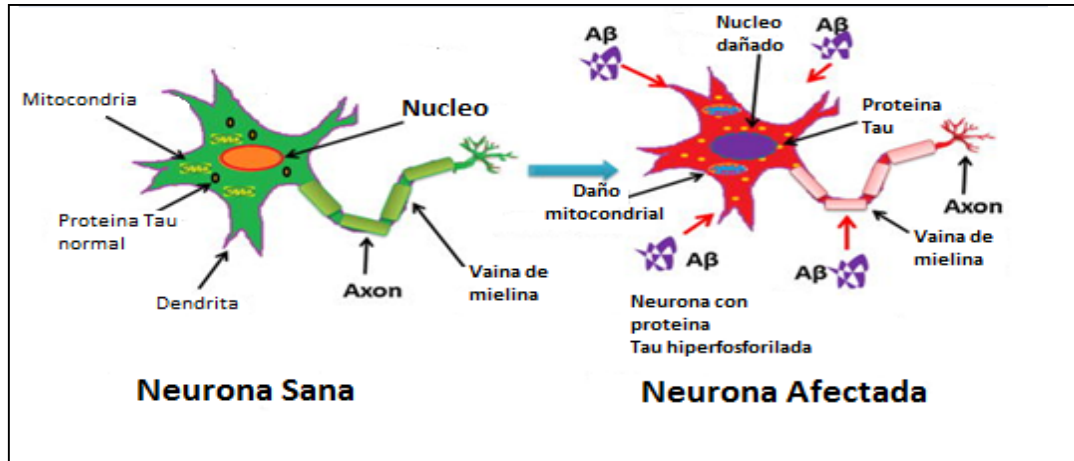


Figura 1. Cambios comparativos en neuronas sanas y neuronas anormales implicadas en la patogénesis de la EA. La función anormal de las neuronas afectadas se debe a la presencia de depósitos de péptido A β , proteína Tau fosforilada lo que activa varias quinasas relacionadas con el estrés que dan como resultado núcleos dañados y mitocondrias en neuronas afectadas en la patogénesis de la EA. Modificada de Kamat PK. y cols.(9)

3.1.1 ETIOLOGIA

Se piensa que se produce por una combinación de susceptibilidad genética sumada a la exposición a factores ambientales, donde interactúan factores de riesgo como la edad y el sexo, ya que aumenta la probabilidad de padecer esta enfermedad a partir de los 60 años, se ha visto que las mujeres son más prevalentes en esta patología. El primer caso neuropatológico de un paciente afectado por EA se describió hace más de 100 años, se describió la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el cerebro, dos características principales de la EA (10).

Se han descrito dos formas de EA: una forma esporádica o senil, y una forma familiar o forma presenil. El primero se desarrolla en el 95-98% de los casos, mientras que los casos familiares están limitados a solo el 2-5%. El inicio de la forma esporádica de EA ocurre típicamente en pacientes después de los 65 años de edad, mientras que el inicio de la forma familiar ocurre generalmente antes de esta edad. Ningún gen es directamente responsable del inicio de la EA esporádica, pero se ha informado una asociación con polimorfismos del gen ApoE. Las mutaciones de herencia dominante en genes que incluyen APP, PSEN1 (Presenilina 1) y PSEN2 (Presenilina 2) pueden acelerar la producción de A β , lo que resulta en el desarrollo de EA generalmente antes de los 60 años (10, 11).

La apolipoproteína E (apoE) es una proteína de transporte de lípidos de 299 aminoácidos expresada como tres isoformas diferentes: apoE2, apoE3 y apoE4. E3 es la isoforma más común, y E4 es responsable de una predisposición genética a la enfermedad de Alzheimer. Si bien el transporte del colesterol es su función primaria, la apoE también regula el metabolismo, la agregación y la deposición del amiloide β (A β). El alelo E4 de la apoE es un factor de riesgo importante para la enfermedad de Alzheimer, debido que elimina lentamente los depósitos del péptido A β , en comparación a ApoE2 y ApoE3 que eliminan el péptido a una velocidad considerablemente más alta (11, 12).

3.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Según cifras de la OMS del año 2017, en el mundo entero hay unos 50 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos. La enfermedad de Alzheimer, es la forma más común de demencia, y acapara entre un 60% y un 70% de los casos, es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en el mundo entero. La mayoría de los pacientes que desarrollan la enfermedad son mayores de 65 años (forma de comienzo tardío), mientras que el 5 % de los pacientes presentan la forma de comienzo temprano, por lo general entre

los 40 y 60 años. La incidencia de la EA aumenta exponencialmente a partir de los 65 años (1,5 casos/1.000 personas-año), llegando a 69,2 casos/1.000 personas-año en las personas con edades superiores a los 90 años en nuestro medio. La incidencia en mujeres es superior a la de los hombres (13). Acorde a los cálculos proyectados a 2020 y 2040 la prevalencia en mayores de 60 años será de 4.1 y 9.1% para la región latinoamericana evidenciando un aumento significativo si comparamos con las cifras estimadas en años anteriores (en 2001 la cifra era de 1.8%) (14).

3.1.3 FISIOPATOGENIA DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La neuropatología de la EA es muy compleja y aún no está del todo esclarecida. Existen numerosas hipótesis que intentan explicar los mecanismos patológicos de la enfermedad. La acumulación del péptido β -amiloide en el parénquima y en la vasculatura del cerebro es un evento invariante en la patogénesis de los casos de Alzheimer familiares y esporádicos (15). Unas de esas hipótesis indican que los pacientes con EA muestran pérdida de la actividad colinérgica en el sistema nervioso central, el cerebro de estos pacientes presenta concentraciones bajas del neurotransmisor acetilcolina, especialmente en áreas asociadas con la memoria y el aprendizaje; la disminución de la actividad colinérgica afecta la transmisión sináptica e inicia un proceso inflamatorio. Otra hipótesis sugerida, es la cascada amiloide, que propone como la principal causa de la enfermedad, un péptido denominado β -amiloide ($A\beta$), y debido a su mal plegamiento extracelularmente provoca acumulación y formación de placas seniles (16). Estas placas seniles están compuestas principalmente por depósitos anormales de péptido $A\beta$. El péptido es originado por cortes proteolíticos originados de una proteína denominada proteína precursora de amiloide (APP).

Otra afección está implicada en el desarrollo de EA, la cual produce ovillos neurofibrilares que están compuestos principalmente por proteína Tau, está asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, la cual se hiperfosforila, se disocia de los microtúbulos y se auto-agrega en el citosol para formar filamentos helicoidales pareados. asociada al microtúbulo enriquecida con axones, específica del cerebro (17). Sin embargo, dado que la

proteína Tau hiperfosforilada parece estar presente también en otras enfermedades neurodegenerativas, y dado que todas las mutaciones genéticas identificadas actualmente como responsables de la EA, invariablemente producen una mayor formación de A β fibrillogénico, la hipótesis de la cascada amiloide es el evento más ampliamente aceptado para la patogénesis de la EA (10).

Las diferentes formas de depósitos, oligoméricas y protofibrilares de péptidos A β pueden facilitar la hiperfosforilación de Tau; la alteración de la función del proteasoma y de la mitocondria; la desregulación de la homeostasis del calcio, provocan el fallo sináptico y la disfunción cognitiva en la EA (Figura 2)(18). Los síntomas conductuales de la EA se correlacionan con la acumulación de placas y ovillos, y son una consecuencia directa del daño y la destrucción de las sinapsis que median la memoria y la cognición.

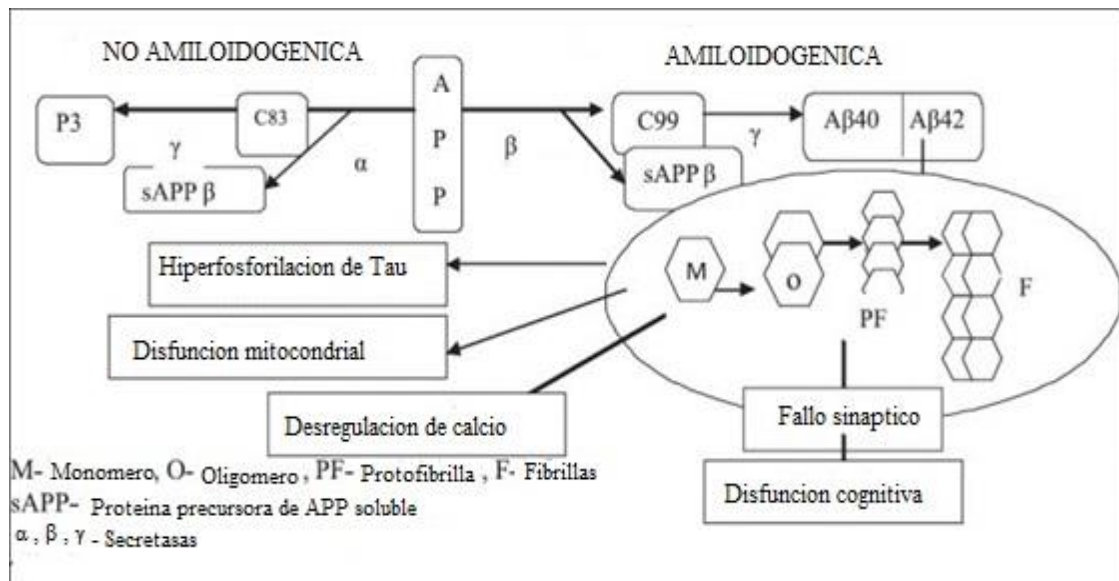


Figura 2. Hipótesis de cascada amiloide. Los estados de ensamblaje intracelular de A β son monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Las especies monoméricas no son patológicas, sin embargo, la formación de fibrillas hace que el A β sea tóxico. Las especies oligoméricas y protofibrilares pueden facilitar la hiperfosforilación de Tau, la alteración de la función de la mitocondria, la desregulación de la homeostasis del calcio, el fallo sináptico y la disfunción cognitiva. Modificada de Mohandas, E. (18)

3.2 PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE (APP) Y PROCESAMIENTO DE PEPTIDO A β

La APP es una proteína que desempeña un papel importante en una variedad de actividades biológicas, incluido el desarrollo neuronal, la señalización, el transporte intracelular y otros aspectos de la homeostasis neuronal (16). La APP es una glicoproteína transmembrana de tipo I que se expresa en una amplia variedad de células, es miembro de una familia compuesta por tres genes. La familia APP en mamíferos consta de tres miembros: APP, la proteína APP like-1 (APLP1) y la proteína APP like-2 (APLP2). En humanos, el gen APP está ubicado en el cromosoma 21 (21q21.3), contiene 18 exones y se extiende a una distancia de aproximadamente 240 kb (19). Se produce como varias isoformas diferentes, que varían en tamaño de 695 a 770 aminoácidos. La isoforma 695 de APP se expresa principalmente en neuronas, mientras que APP751 y APP770, que contienen el KPI, dominio inhibitorio de la serina proteasa tipo Kunitz, se expresan principalmente en células periféricas y plaquetas (16).

La escisión de la APP puede realizarse por 2 procesos proteolíticos, dependiendo si ocupa una α o β -secretasas, producen grandes fragmentos solubles N-terminales sAPP y sAPP, y fragmentos C-terminales ligados a membrana C83 y C99, respectivamente, que pueden ser divididos por γ -secretasas (20). La proteólisis de la APP ocurre a través de las llamadas vías no amiloidogénicas y amiloidogénicas (Figura 3). El primer paso de la vía no amiloidogénica se lleva a cabo por la enzima α secretasa que descompone la APP en sAPP α . Este paso inicial también puede ser impulsado por la enzima β -secretasa, que constituye vía amiloidogénica, al escindir la APP. (21).

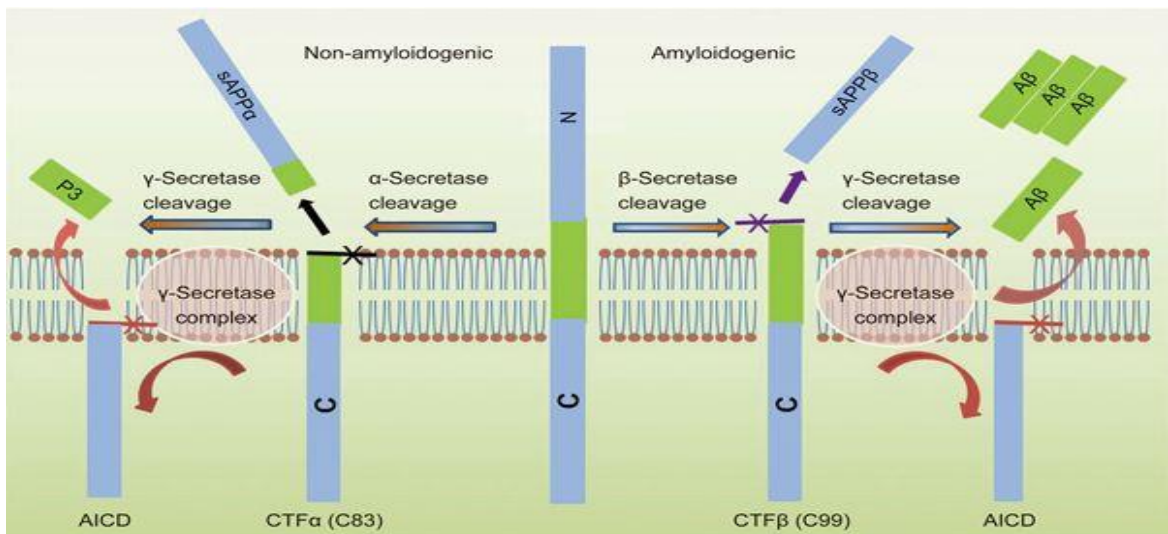


Figura 3. APP proteolítica de las vías humanas. Vía no amiloidogénica y amiloidogénica. El procesamiento no amiloidogénico de APP se refiere al procesamiento secuencial de APP por α -secretasas unidas a membrana, que se escinden dentro del dominio $A\beta$ para generar el fragmento $CTF\alpha$ (C83) atado a la membrana y el fragmento N-terminal $sAPP\alpha$. El procesamiento mieloidogénico de la APP se lleva a cabo mediante la acción secuencial de las β y γ secretasas unidas a la membrana. La β -secretasa divide la APP en los fragmentos β -terminales C ($CTF\beta$ o C99) atados a la membrana y $sAPP\beta$ N-terminal. Extraída de Chen G. (2017) (16).

El péptido tiene dos isoformas predominantes: $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. Los péptidos $A\beta$ pueden variar en tamaño (38 a 43 aminoácidos) porque el corte por γ -secretasa es algo impreciso, el $A\beta_{40}$ es el más abundante (80–90%), seguido por $A\beta_{42}$ (5–10%) (22). $A\beta_{42}$ es más hidrofóbica, más propensa a formar agregados, se considera una isoforma neurotóxica y es el componente mayoritario de las placas amiloides. En condiciones fisiológicas se produce sobre todo $A\beta_{40}$, mientras que los pacientes con EA tienen una elevada producción de $A\beta_{42}$. Muchos estudios han encontrado que una sobreproducción de este péptido tiene efectos neurotóxicos (23). El plasma $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ aumentan con la edad y están fuertemente correlacionados entre sí. Los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en plasma están elevados en algunos pacientes antes y durante las primeras etapas de la EA, pero luego disminuyen. Los niveles elevados de $A\beta_{42}$ en plasma también pueden estar asociados con la mortalidad en pacientes con EA y además esta especie son altamente fibrilogénicas y se depositan temprano en individuos con EA (18, 24).

Al ser procesado el péptido, el transporte será mediado por el receptor de A β a través de la barrera hematoencefálica (BBB) que regula los niveles de A β en el cerebro. La concentración de A β soluble en el SNC, que es fundamental para la formación de la especie A β oligomérica neurotóxica y las formas agregadas vasculares de A β , está críticamente influenciado por el intercambio de transporte A β a través de la BBB (16). Se ha informado que este proceso de transporte está regulado por receptores, como los productos finales de glicación avanzada (RAGE), o la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1)(22).

Por otro lado la EA está fuertemente relacionada con enfermedades vasculares, como el accidente cerebrovascular y la aterosclerosis (4). Se conoce que las plaquetas son fuente importante en la secreción de péptido A β plasmático. El péptido A β liberado de plaquetas activadas, por la secreción de moléculas vasoactivas por la inflamación vascular, pueda contribuir a la formación de trombos, por lo tanto, las deposiciones de A β en una pared de un vaso dañado al comienzo de la EA pueden ser el inductor de CAA. Dado toda esta información, hay evidencia que las plaquetas contribuyen para el desarrollo de este proceso (7).

3.3 PLAQUETAS Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las plaquetas, responsables de los procesos de la hemostasia y la trombosis. Se forman a partir de vesículas que se desprenden en grandes cantidades de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos. Los principales componentes de las plaquetas son la membrana plasmática, los gránulos, el citoesqueleto y el sistema de membrana interno (25). Su vida media es de 7-10 días y en su membrana tiene diferentes glicoproteínas que funcionan como receptores de sus agonistas fisiológicos (ADP, TXA₂, trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, factor de von Willebrand) y para ligandos como el colágeno, además posee y libera diferentes gránulos (α y densos) para mantener su función más conocida que es la de mantener la hemostasia.

Aunque la EA es una enfermedad neurológica, estudios recientes han asociado un importante papel de las plaquetas en esta patología. Existe una fuerte evidencia de que las plaquetas se ven afectadas durante la progresión de la EA, por ejemplo mostrando un aumento de la activación plaquetaria en pacientes con EA, alteración del volumen plaquetario, pero también expresión diferencial de biomarcadores, como son, la acumulación de péptidos A β y la hiperfosforilación de Tau (26). Esto se restringe a las células nerviosas ya que se sabe que en condiciones patológicas, los péptidos A β son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, y en este caso, el aumento de la activación de las plaquetas observada en los modelos de ratones con EA debería ser una consecuencia de esta fuga y la mayor cantidad de péptidos A β en la sangre que a su vez pueden activar las plaquetas (27).

Las plaquetas expresan la proteína precursora de amiloide (APP) y muestran la maquinaria enzimática completa (Figura 4) para procesar las proteínas de APP en péptidos A β (4). La proporción de las dos isoformas de la APP está notablemente alterada en las plaquetas con personas con EA (28). La APP plaquetaria puede representar la fuente principal de A β detectada en la sangre, y los hallazgos recientes han sugerido que el metabolismo de la APP plaquetaria también podría contribuir a la acumulación de A β en el cerebro y su vasculatura a través de la barrera hematoencefálica (10).

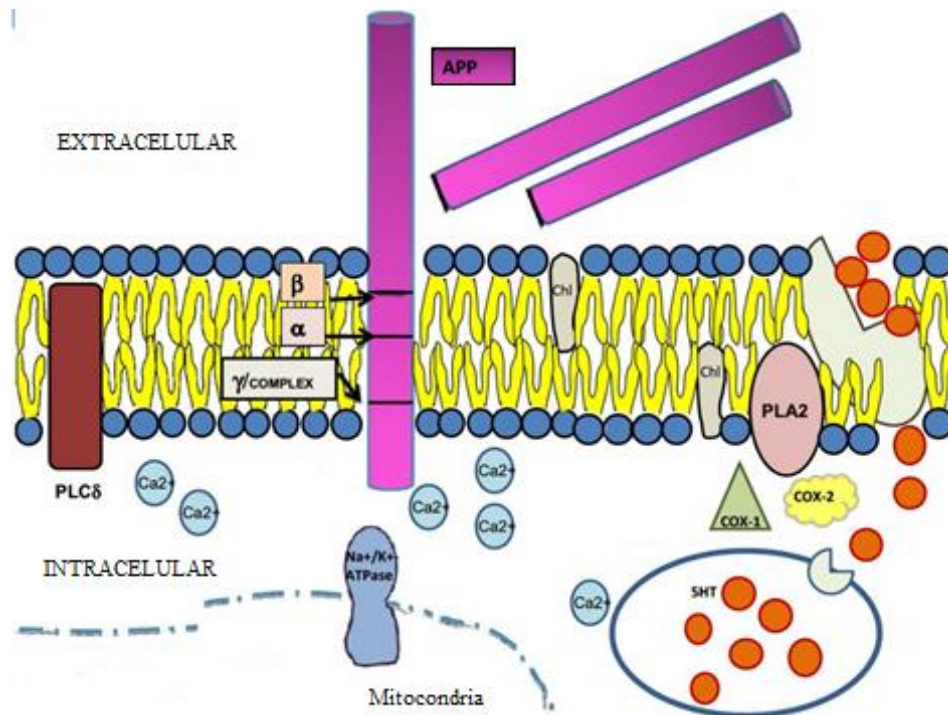


Figura 4. Anormalidades en las plaquetas de EA. Algunas actividades de membrana (secretasas, fosfolipasas), citosólicas (ciclooxigenasas) están comprometidas en las plaquetas de la EA. Las alteraciones son evidentes en el procesamiento de la APP, la fluidez de la membrana y los niveles de colesterol; en los niveles de serotonina / captación y los niveles intracelulares de Ca²⁺. Modificada de Caticala, S. (2012) (10).

Estudios han mostrado que las plaquetas contienen y son capaces de secretar péptidos Aβ, tanto en condiciones fisiológicas y patológicas. Esto es posible debido a que las plaquetas poseen la maquinaria necesaria para realizar el procesamiento del APP, a través de la acción secuencial de las β secretasas y γ secretasas. Las plaquetas contienen altas cantidades de APP (principalmente las isoformas 770 y 751), que se insertan en la membrana plasmática y los gránulos (7). Los péptidos Aβ plaquetarios se almacenan en gránulos de plaquetas específicos, denominados gránulos α, y se liberan tras la activación en el sitio del daño vascular. Los péptidos Aβ derivados de plaquetas a su vez activan otras plaquetas presentes en los pacientes afectados (27).

Los péptidos Aβ en plasma estimulan la activación plaquetaria, promueven la producción de ROS, la adhesión plaquetaria y la formación de trombos. La acumulación de Aβ en los vasos cerebrales también contribuye a un estado neuroinflamatorio crónico que

consecutivamente puede exacerbar la activación plaquetaria y viceversa. Se ha investigado que se produce una pequeña cantidad de péptidos A β en plaquetas en condiciones fisiológicas y patológicas a través de la acción secuencial de las β secretasas y γ secretasas (29).

Además diversos estudios han demostrado que las plaquetas son la fuente principal de péptido A β_{40} en la circulación (90%)(30), por consiguiente provoca la acumulación y formación de las placa seniles, características de esta patología. Además existe mucha evidencia, por varios autores, que este péptido es capaz de provocar diversos efectos, tales como, inducir agregación plaquetaria, formación de ROS etc. En la siguiente Tabla 1 se enuncian los efectos en las plaquetas.

Tabla 1. Efectos moleculares de A β_{40} en plaquetas.

Efectos moleculares de Aβ_{40} en plaquetas
Promueve la agregación plaquetaria
Promueve la formación de ROS, activación de caspasas, exposición de anexina V
Promueve la adhesión plaquetaria bajos condiciones de flujo dinámico y estático
Incrementa la adhesión plaquetaria en un modelo de daño en arteria carótida
Modulación de A β soluble hacia fibrillas de A β
Reclutar plaquetas para placas mieloides vascular.

Modificada de Cannobio, I. y cols. (2015) (2).

Este péptido es la base para el concepto de Alzheimer de que la acumulación de A β en el cerebro tiene principalmente una fuente neuronal. ¿Por qué la proteína A β de origen plaquetario ha sido generalmente ignorada? Hay dos explicaciones posibles: primero el tamaño de las plaquetas es significativamente menor que el de otras células sanguíneas y dos, la APP y el A β se secuestran en los gránulos de plaquetas y se liberan solo después de la activación. Juntas, estas explicaciones crean la impresión de que la liberación de A β por las plaquetas se produce en concentraciones muy bajas (28).

Las plaquetas al activarse, son la mayor fuente de A β ₄₀ sanguíneo, una vez en circulación, este péptido se puede unir a tres posibles receptores en las plaquetas, como PAR1 (receptor de trombina y activador de calpaína), integrina α IIb β 3 y RAGE (productos finales de glicación avanzada) (22), este último cobra gran importancia debido a su expresión en el endotelio de la barrera hematoencefálica, porque media el transporte de A β al cerebro (16). Estas vías para el transporte de A β entre el cerebro y la sangre implican que el metabolismo periférico de A β podría estar involucrado en la patogénesis de la EA (31), lo que se sugiere que las plaquetas como principal fuente de A β tiene una gran importancia en el desarrollo de esta patología.

RAGE es una pequeña proteína transmembrana de 35 kDa, que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y desempeña un papel en la inmunidad innata. RAGE se compone de tres dominios extracelulares similares a Ig (Vd, C1d, C2d), con un solo dominio transmembrana y una cola corta C-terminal citoplásmica. Este receptor se describe como un receptor de "reconocimiento de patrones" debido a su capacidad para reconocer motivos estructurales comunes (32). RAGE es capaz de unirse a múltiples ligandos con preferencia por moléculas que son propensas a la agregación y modificaciones postraduccionales tales como los AGE, grupo de alta movilidad box-1 (HMGB1) y péptido A β . RAGE participa en la liberación de A β nivel de Barrera hematoencefálica y sanguínea (33). Aunque no está esclarecida la función de RAGE en las plaquetas, tendría un papel de mucha importancia en la progresión de EA

Por otra parte, varias vías de señalización intracelular, importante para la activación plaquetaria, inducen un aumento de la concentración intracelular de calcio en las plaquetas que estimula la secreción de gránulos α , lo que implican moléculas esenciales, que también se han descrito para modular el procesamiento de APP (10, 16). Dentro de esas moléculas esenciales, destaca la calpaína, a la cual se le atribuye la función de producir péptido A β a través del procesamiento de la APP, durante la activación plaquetaria (34).

3.4 CALPAINA Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Las calpaínas son una familia de cisteín proteasas intracelulares activadas por calcio que participan en muchos eventos fisiológicos, incluida los ataques neurotóxicos que van desde la isquemia hasta la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la calpaína mejora la memoria y la transmisión sináptica en el modelo de ratón de EA (35). Existen varias isoformas de calpaína, las que incluyen calpaína 1 (μ -calpaína), calpaína 2 (o m-calpaína), y calpaína 10, entre otras, que se expresan de manera ubicua. Las dos isoformas convencionales (calpaína 1 y 2) “son heterodímeros compuestos por distintas subunidades catalíticas de 80 kDa y una subunidad reguladora idéntica de 28 kDa. Característicamente, las enzimas difieren en su requerimiento de calcio para la activación *in vitro*, en que μ -calpaína es activado por concentraciones micromolares de calcio mientras la activación de m-calpaína requiere concentraciones milimolares de calcio” (36). Varios estudios han resaltado la importancia de las calpaínas en diferentes procesos de activación de plaquetas incluyendo propagación, agregación, secreción de gránulos y señalización de integrina. La activación normal de la calpaína desempeña un papel importante en los procesos de señalización. La activación anormal de la calpaína, a su vez, es responsable de la degradación de la mayor parte del pool de proteínas celulares, incluyendo proteínas de señalización, factores de transcripción y sustratos citoesqueléticos. Dado que el calcio está elevado en los cerebros EA, es probable que la pérdida de la homeostasis de calcio interrumpa los procesos fisiológicos que regulan la actividad de la calpaína en las células, conduciendo a la desregulación de la actividad de la calpaína (37).

Se evidenció que la activación de calpaína aumenta los niveles de β -secretasa en un modelo de ratón transgénico de EA. Utilizando ratones transgénicos que sobreexpresan APP, estudios de Ferreira y cols. demostraron que la deficiencia de calpastatina (inhibidor endógeno de calpaína) mejoró la activación de calpaína, provocó la producción de $A\beta$ y aumento de la mortalidad. A su vez, el aumento de los niveles de $A\beta$ conduce a un aumento

de Ca^{2+} y aumento de la activación de calpaína (38) (Figura 5). Además la calpaína podría estar involucrada en la fosforilación de la proteína Tau aumentando el daño neurodegenerativo. La sobreactivación de la calpaína contribuye a la hiperfosforilación de la Tau, característico de la EA a través de la activación de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), seguida de la escisión de su proteína reguladora, p35 (39).

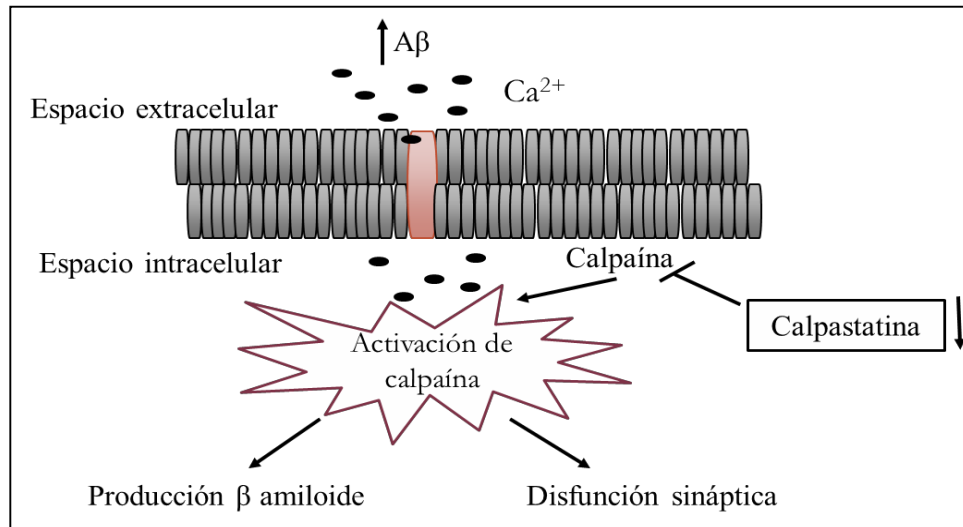


Figura 5. Actividad de la calpaína desempeña un papel importante en enfermedad de Alzheimer. El aumento de los niveles de beta- amiloide (Aβ) inducen el flujo de calcio (Ca^{2+}) a través de los receptores NMDA (NR1 y NR2) en las neuronas del hipocampo. Este influjo de Ca^{2+} y una disminución en los niveles de calpastatina resultan en la desregulación de la actividad de la calpaína que conduce a la escisión de una serie de proteínas implicadas en la formación de placas seniles. Modificada de Ferreira A.(40).

La calpastatina también parece desempeñar un papel importante en la regulación de la activación de la calpaína en la EA. Por lo tanto, se ha demostrado que la calpastatina está notablemente empobrecida en la corteza de los cerebros EA en las últimas etapas de la enfermedad, en comparación con los controles pareados por edad. Las áreas focales de la depleción de calpastatina también se han detectado a lo largo de neuritas distróficas en las primeras etapas de la EA. Por otro lado, no se detectaron cambios en los niveles de calpastatina en las neuronas menos susceptibles a la neurodegeneración en las células de EA como Purkinje. Esta disminución en los niveles de calpastatina es el resultado de la actividad

proteolítica de las caspasas y la calpaína. A su vez, la disminución de la relación calpastatina a calpaína provoca hiperactivación de calpaína perpetuando este efecto de deletéreo celular (40).

Por otra parte, el deterioro de la cognición y la memoria pueden estar asociadas con la regulación por disminución de la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) en el cerebro en pacientes con EA, pero el mecanismo molecular que conduce a la regulación a la baja no se entiende (41).

La actividad CREB está regulada principalmente por la vía cAMP – PKA – CREB. Cuando una señal llega a la superficie celular, se activa el receptor correspondiente, el cual, a su vez, conduce a la elevación transitoria de cAMP intracelular y en consecuencia activa PKA disociando las subunidades reguladoras (subunidades R) de las subunidades catalíticas (subunidades C). La PKA activada se mueve entonces en el núcleo celular, donde activa CREB mediante la fosforilación de ella. PKA es una holoenzima tetramérica que consiste en dos subunidades de C y dos subunidades R en ausencia de Camp (Figura 6). Varias isoformas tanto de subunidad C ($C\alpha$, $C\beta$, y $C\gamma$) y R subunidad ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ y $RII\beta$) se han encontrado en tejidos de mamíferos. La isoforma $C\alpha$ se expresa de forma ubicua en la mayoría de tejidos, mientras que la isoforma $C\beta$ es altamente expresado en el cerebro. PKA- $C\gamma$ se expresa sólo en los testículos. Todas las cuatro isoformas de las subunidades R se expresan en el cerebro humano. La subunidad R no sólo controla la actividad de PKA, pero también se localiza la quinasa dentro de la célula (41).

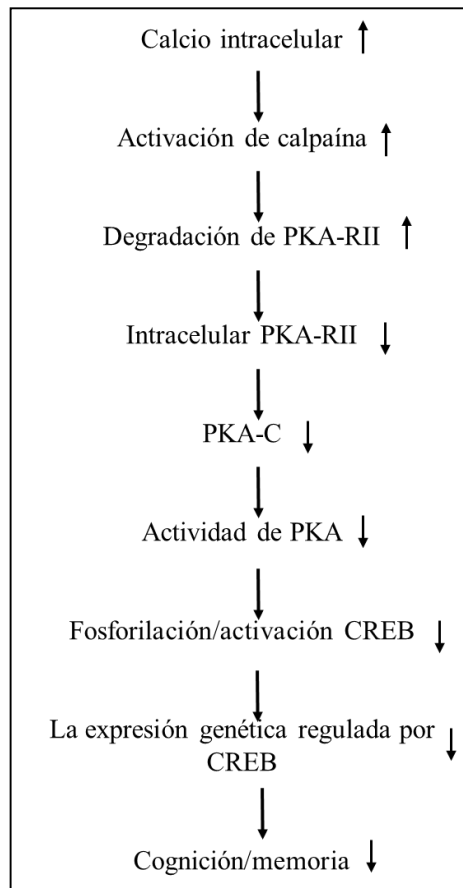


Figura 6. Esquema propuesto de desregulación de CREB. Un esquema propuesto de la desregulación de la proteína de unión al elemento de respuesta a la calpaína-cAMP dependiente de la proteína kinasa (PKA) -cAMP-respuesta al elemento (CREB) en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer. Extraída y modificada de Liang, Z. y cols. (2007) (41).

Esta vía ocurre principalmente en neuronas, pero en plaquetas se ha visto que tiene importancia en la agregación plaquetaria. Se ha demostrado que la calpaína-1 regula la agregación plaquetaria y las vías de retracción del coágulo a través de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). El papel específico de la calpaína-2 en las funciones plaquetarias sigue sin estar claro. En plaquetas de ratón, ~ 80% de la actividad de proteasa de calpaína total es contribuida por calpaína-1, mientras que calpaína-2 representa el 20% restante (42).

La deficiencia completa de calpaína-1 causa una reducción significativa en la agregación plaquetaria y la retracción del coágulo. Sin embargo, las plaquetas nulas de la calpaína-1 presentan un deterioro de la fosforilación de la tirosina de varias proteínas, incluida la

subunidad beta3 de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, que se correlaciona con la reducción inducida por agonistas en la agregación plaquetaria. Estos resultados proporcionan la primera evidencia directa de que la calpaína-1 es esencial para la función plaquetaria normal, no afectando la escisión de las proteínas del citoesqueleto sino regulando potencialmente el estado de la fosforilación de tirosina de las proteínas plaquetarias PTP1B (43). Además varios estudios han resaltado la importancia de las calpaínas en muchos pasos diferentes del proceso de activación de las plaquetas, incluida la propagación, la agregación, la secreción de gránulos y la señalización de la integrina (Figura 7).

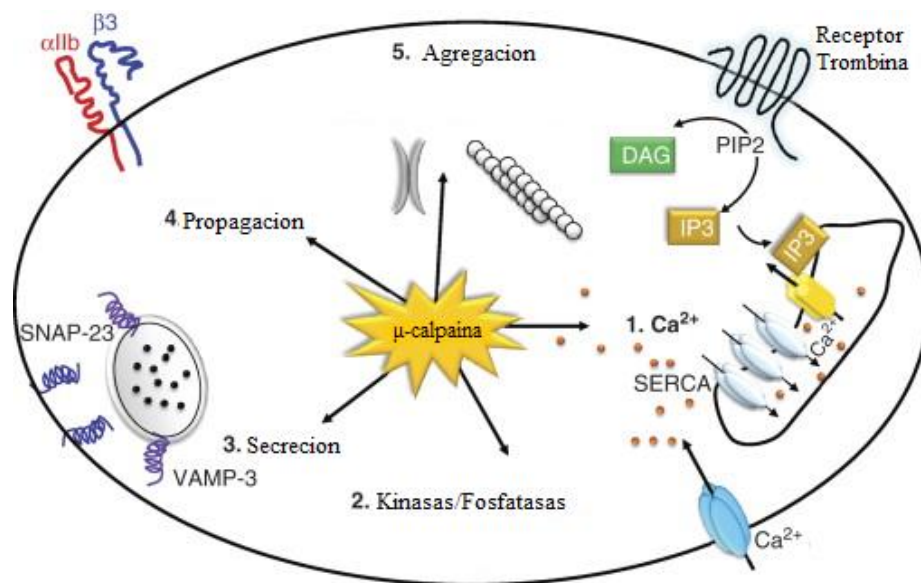


Figura 7. Papel de la calpaína en la activación plaquetaria fisiológica La activación de la calpaína conduce a la proteólisis limitada de (1) Ca^{2+} -ATPasas (por ejemplo, SERCA-2) que regulan la señalización de Ca^{2+} de las plaquetas, (2) quinasas involucradas en cascadas de señalización, (3) proteínas involucradas en la desgranulación de las plaquetas, como SNARE, y (4 y 5) proteínas asociadas al cambio de la forma de las plaquetas, la propagación, la agregación y la retracción del coágulo. Modificada de Randriamboavonjy, V. (2010) (36).

También se ha visto que la activación de la calpaína tiene un rol en la secreción de gránulos α de las plaquetas. Tras la activación de las plaquetas, la secreción de gránulos α es un paso necesario para mantener la onda secundaria de agregación de plaquetas y la consolidación de la adhesión de plaquetas a plaquetas durante la retracción del coágulo. Las

proteasas intracelulares, particularmente las calpaínas, se han implicado en la modulación de los procesos secretores de las plaquetas. Por ejemplo, la secreción de gránulos α en plaquetas humanas, medida por expresión de la superficie de p-selectina, fue bloqueada por los inhibidores de la calpaína (44). Por lo tanto la calpaína al tener acción en la secreción de estos gránulos, tiene relación con la liberación de péptido A β plaquetario, por lo que resulta trascendental conocer que ruta conlleva a este proceso y así, tener una vista nueva para posibles terapias prevenir y o disminuir la progresión de EA.

Según un estudio reciente de nuestro laboratorio, de Sepulveda y cols. demostraron que la ruta de cAMP/PKA juega un papel clave en la regulación de la secreción de A β en plaquetas humanas, al menos en parte debido a la inhibición de la actividad de la calpaína. Al ocupar con Forskolin 20 μ M, (inhibidor de la función plaquetaria por el aumento de los niveles de cAMP), se describió una disminución de 2.1 veces la actividad de la calpaína, un efecto que se invierte casi totalmente cuando se usó un inhibidor de la proteína PKA responsable de la fosforilación de la calpaína que produce su inhibición, por lo que confirmaron que la activación de la calpaína es esencial para el procesamiento y la secreción del péptido A β (22).

Los péptidos A β secretados por las plaquetas y células endoteliales dan lugar a la activación plaquetaria, con consecuencias peligrosas para la progresión de la EA. Con estos antecedentes, parece razonable la búsqueda de moléculas o compuestos, como el uso de agentes antiplaquetarios, logren reducir el desarrollo de la EA. La prostaglandina E1 es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria por lo que se utilizará para analizar si reduce la secreción de péptido.

3.5 PROSTAGLANDINA E1 (PGE-1) EN PLAQUETAS

Las prostaglandinas son un grupo de compuestos biológicos muy potentes que se

sintetizan en los tejidos a partir del ácido araquidónico. Forman parte del grupo de eicosanoides, que presentan una estructura general de ácido carboxílico insaturado de 20 carbonos con un ciclopentano. Los eicosanoides se sintetizan a partir de 20 carbonos poliinsaturados. Estos ácidos grasos están presentes en los fosfolípidos de las membranas celulares de todos los tejidos. Estos ácidos grasos se obtienen directamente de la dieta o de la elongación y desaturación de los ácidos grasos esenciales (45). Los eicosanoides consisten en las siguientes moléculas: prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) y lipoxinas (LX). Los PGs y TXs son identificados colectivamente como prostanoides. Todas las células de los mamíferos, excepto los eritrocitos, sintetizan los eicosanoides (46).

La prostaglandina E1 (PGE-1), también conocida farmacológicamente como Alprostadil (Figura 8), es un potente agente vasodilatador periférico, inhibidor de la agregación plaquetaria y broncodilatador. Posee importantes efectos farmacológicos que justifican su utilidad clínica, tales como vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, estimulación del músculo liso intestinal y uterino (47). La PGE-1 es crucial para mantener el conducto arterioso persistente en la cardiopatía congénita crítica para la supervivencia y paliación de los bebés especialmente prematuros hasta que se disponga de una intervención cardioquirúrgica (48).

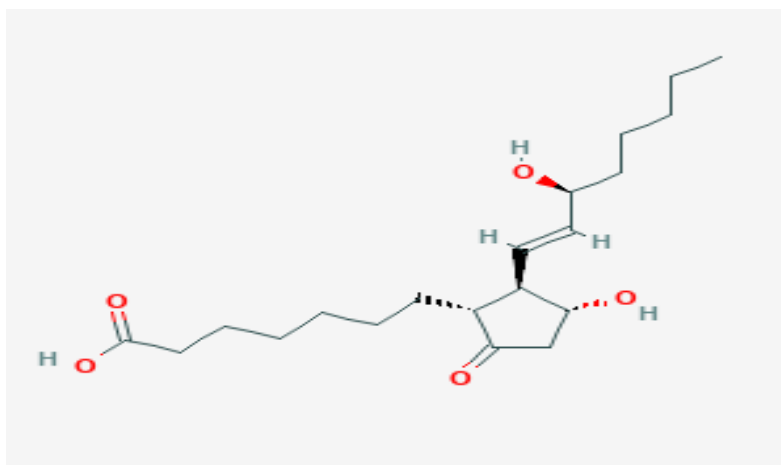


Figura 8. Estructura de Prostaglandina E1 Extraída de: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Alprostadil,

Según estudios de Lui X.L. en ratas cirróticas tratadas con PGE-1 tenían menos hepatoesplenomegalia, menores niveles séricos de alanina aminotransferasa y presiones portal, y una presión arterial más alta que las ratas cirróticas tratadas con placebo. Se menciona que existe diversos mecanismos de citoprotección hepática de PGE-1: inhibe la citotoxicidad mediada por células T, mejora la síntesis de ADN del hígado lesionado después de una hepatectomía parcial mediante la estimulación de la producción de AMP cíclica, aumenta el nivel de ATP en el tejido hepático para acelerar la recuperación de la función respiratoria mitocondrial después de la reperfusión, y microviscosidad de membrana estabilizadora (49).

Las prostaglandinas se liberan en la sangre de las células en respuesta a estímulos mecánicos, neurales y hormonales y, a su vez, pueden afectar las funciones de las células sanguíneas. Las prostaglandinas en concentraciones muy bajas (nano molar) controlan las funciones de eritrocitos y plaquetas. Los eritrocitos humanos son altamente sensibles a las prostaglandinas, aunque no exhiben actividad adenilato ciclasa. Aunque los eritrocitos humanos no parecen sintetizar o degradar las prostaglandinas, responden directamente a las prostaglandinas en concentraciones plasmáticas (50).

Según estudios se evidenció que las plaquetas pueden sintetizar PGE-1, que a su vez es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. Las plaquetas son capaces de sintetizar PGE-1, a partir del ácido dihomogammalinolénico (DGLA) (C20: 3), el metabolito de la desaturasa A6 del ácido linoleico, y se cree que es uno de los reguladores fisiológicos endógenos de la función plaquetaria. Se ha encontrado que el aumento de los niveles de cAMP conduce a la inhibición de la agregación plaquetaria, también estimula la síntesis intracelular de PGE. La estimulación de la síntesis de PGE-1 por cAMP en plaquetas también se logró mediante el uso de PGD₂ y PGI₂, que se sabe que aumentan los niveles de cAMP en estas células. Puede ser posible que el aumento de cAMP por prostaciclina o PGD₂ sea un efecto directo de esos prostanoides, o sea mediado indirectamente a través de la producción de PGE, en la plaqueta (45).

El efecto que provoca la Prostaglandina E1 en las plaquetas es de estimular la actividad de la enzima adenilato ciclasa, lo que tiene como acción de ser un potente inhibidor de la agregación plaquetaria *in vitro*. En específico, PGE-1 se une al receptor de prostaciclina (IP) en plaquetas, aumenta el cAMP intracelular que inhibe activación de fosfolipasa C, y reduce la movilización de calcio de tiendas intracelulares (51) (Figura 9). Según estudios de Iyú, el receptor EP3 está involucrado en la mediación de los efectos de PGE1 en la función plaquetaria, por lo tanto, los efectos generales de PGE1 en la función plaquetaria reflejan un equilibrio entre los efectos opuestos en los receptores EP3 e IP sin la participación de EP4 (52).

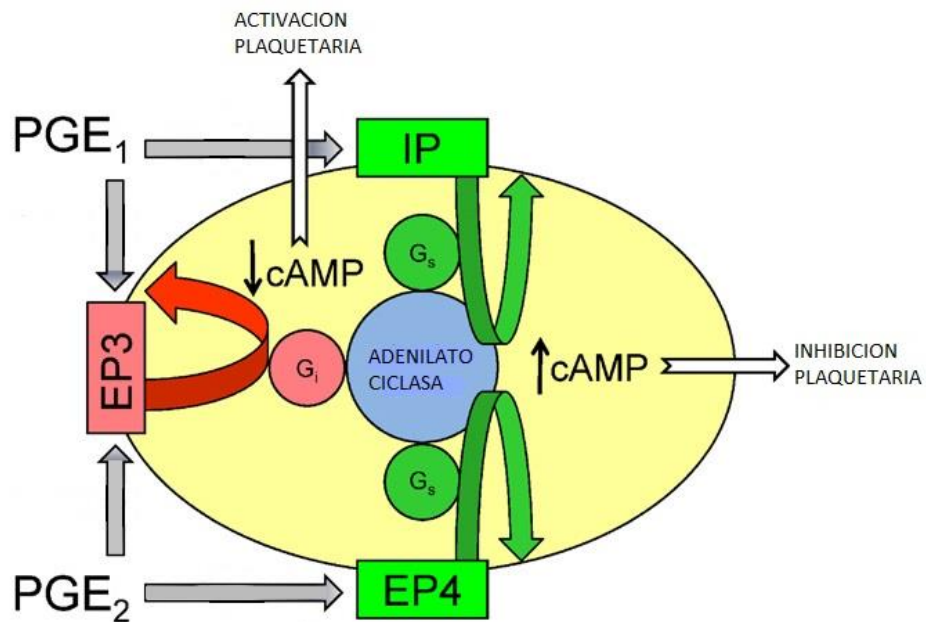


Figura 9. Receptores de PGE1 y PGE2. Su efecto en la adenilato ciclasa, que median en la función plaquetaria. Modificada de Iyú (52).

Por lo tanto, la PGE-1 antagoniza los efectos de la activación del receptor P2Y1. La activación de P2Y1, que es un receptor acoplado a Gq unido a la fosfolipasa C, genera inositol 1,4,5-trisfosfato y va seguido de liberación de Ca^{2+} , lo que da como resultado la activación y

agregación plaquetaria (51).

Es sabido que la PGE-1 inhibe la agregación plaquetaria, por aumentar los niveles de cAMP, mediando sus efectos antiplaquetarios. Recientemente se ha vinculado a esta ruta con la inhibición de la liberación del péptido A β por las plaquetas, ya que se esclareció que la ruta de cAMP / PKA juega un papel clave en la regulación de la secreción de A β en las plaquetas humanas, al menos en parte debido a la inhibición de la actividad de la calpaína (22).

En dicho estudio, sin embargo, no se abordaron los posibles gatillantes fisiológicos de esta ruta. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la PGE-1, mediante su receptor IP podría ejercer este efecto. Sin embargo, para corroborar que la PGE1 actúa por esta ruta es necesario diseñar experimentos que evalúen los efectos de esta molécula empleando por ejemplo bloqueadores de sus componentes, así se podría demostrar que la PGE-1 influye en el procesamiento o posterior secreción del péptido A β plaquetario, y por tanto prevenir o disminuir la progresión de la EA que se sugiere como objetivo en este trabajo experimental.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la PGE-1 es capaz de inhibir la secreción plaquetaria del péptido A β ₄₀ asociada a la activación de la calpaína inducida por TRAP-6.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto antiplaquetario de la PGE-1 ante la activación inducida por TRAP-6.
- Estandarizar metodología que permita verificar la secreción del péptido A β ₄₀ por las plaquetas.
- Determinar que la PGE-1 inhibe la activación de la calpaína y liberación del péptido A β ₄₀ inducido por TRAP-6.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 TOMA DE MUESTRA.

Se reclutaron voluntarios aparentemente sanos, sin factores de riesgo cardiovascular y sin consumo de medicamentos antiplaquetarios y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) durante los últimos 10 días. Luego de firmar el consentimiento informado, se obtuvo una muestra de sangre total para aislar plaquetas. Brevemente, se obtuvo 20 mL de sangre total mediante venopunción del antebrazo utilizando sistema Vacutainer 21G x 3/4" (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA) con citrato de sodio 3,2% . Posteriormente las mezclas se homogenizaron por inversión.

5.2 OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) Y PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP)

Para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP), las muestras obtenidas de donantes voluntarios, se centrifugaron por 10 minutos a 1.200 rpm a temperatura ambiente (Eppendorf centrifuge 5804) (Figura 10). Posteriormente se extrajo una alícuota de 1 mL de PRP de cada tubo y se traspasó suavemente a un tubo plástico.

Se le realizó recuento de plaquetas en el contador hematológico VALTEK BC3000 (Figura 11) a la muestra de PRP. A continuación, los tubos iniciales fueron a centrifugados 10 minutos a 3.500 rpm para obtener el PPP. El recuento del PRP fue ajustado con PPP a un recuento entre 200.000-300.000 plaquetas/ μ L.



**Figura 10. Centrifuga EPPENDORF
CENTRIFUGE 5804**



**Figura 11. Contador Hematológico
VALTEK BC3000**

5.3 AGREGACIÓN PLAQUETARIA

La agregación de plaquetas se monitorizó por la detección de cambios de transmisión de luz del PRP ajustado. En primer lugar, se calibró el agregómetro Lumi-dual (Chrono-Log corporation, Haverton, Pensilvania, USA) (figura 12) con PPP (blanco de reacción), se agregó 410 μL de PRP ajustado a la cubeta de reacción que contenía en su interior una barra magnética que permite que el PRP se mantenga en agitación. Luego se estimularon o no con TRAP-6 10 μM y se registraron los resultados durante seis minutos.

El PRP fue pre incubado por 3 minutos a 37°C y luego se adicionó Prostaglandina 1 (PGE-1) (Sigma-Aldrich) a una concentración final 20 μM en la cubeta. Posteriormente, se estimuló con el agonista TRAP-6 10 μM (Trocris bioscience, Bristol, Reino Unido) para iniciar la agregación plaquetaria, siendo el volumen final de reacción 416 μL .

La determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de agregación máxima, pendiente, área bajo la curva y tiempo *lag* de acuerdo al software AGGRO/LINK (Chrono-Log corporation, Haverton, Pensilvania, USA).

La inhibición de la agregación fue calculada de la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición de la agregación} = \left(100 - \frac{(\% \text{AgX} * 100)}{\% \text{AgC}}\right)$$

en donde % AgX: agregación promedio del componente en estudio y %AgC: agregación promedio del control negativo.



Figura 12. Agregometro CRONO-LOG 560

5.4 DOT BLOT

La técnica Dot Blot es una técnica para la inmunodetección similar al Western Blot, pero difiere en que las proteínas a estudiar no están separadas electroforéticamente (53). Para utilizar la técnica de Dot Blot no se requiere de equipos especiales y puede ser utilizado como un ensayo cualitativo para determinar la expresión de alguna proteína o anticuerpo específico. Se deben establecer las condiciones óptimas de trabajo que permitan utilizar la técnica del Dot Blot para determinar la expresión del péptido A β ₄₀.

5.4.1. LAVADO DE PLAQUETAS

La muestra previamente extraída se centrifugó (Eppendorf centrifuge 5804) a 1200 rpm por 10 min, previamente traspasada a un tubo cónico. Finalizada la centrifugación en el sobrenadante el PRP. De esta fase se extrajo aproximadamente 1,3 mL, se agregó en un tubo eppendorf junto con 0,2 mL de ACD (este paso se realizó para 3 tubos), se centrifugaron en una microcentrifuga a 3000 rpm por 10 min. En esta etapa se eliminó todo el plasma del tubo (se guardó para un posterior uso) y se mantuvo el botón de pellet plaquetario, se dispersó por las paredes del tubo 0.2 mL de ACD, con la finalidad de resuspender el pellet. Se prosiguió de misma manera que la anterior, para extraer el ACD (se denominará ACD1) manteniendo el botón con las mismas condiciones de cuidado, y agregar ACD nuevamente, para resuspender el botón. Paralelamente al eliminar el ACD1 se añadió TAF, para homogenizar la muestra donde se denominó “LAVADO 1” donde se midió mediante técnica Dot Blot la expresión del péptido A β ₄₀ plaquetario.

Al continuar con los mismo pasos, se extrajo el ACD (se nombró como ACD2), siguiendo el procedimiento se adicionó 0,4 mL de TAF, y se denominó como LAVADO 2.. La muestra final se midió con técnica Dot Blot.

5.4.2 DISPOSICION DE MUESTRA (GOTA)

Para estandarizar la deposición de la gota en la membrana de polivinil disulfato (PVDF) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), el primer paso fue dimensionar el cuadro de trabajo en la membrana, en donde se graficó cuadros de 1cm X 1 cm, midiendo con regla, se puede observar en la figura 13 y 14.



Figura 13. Grafica de cuadros de trabajo en membrana PVDF.

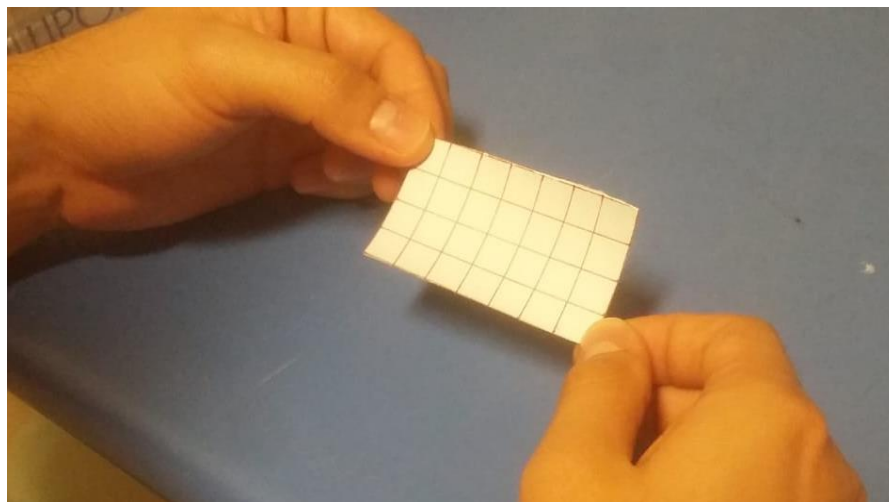


Figura 14. Membrana PVDF dimensionada en cuadros 1cm x 1cm

Con la membrana de trabajo dimensionada, se activó en metanol durante 15 segundos, luego se lava con agua destilada y buffer de lavado entre 2 minutos cada uno, en diferentes recipientes. Figura 15

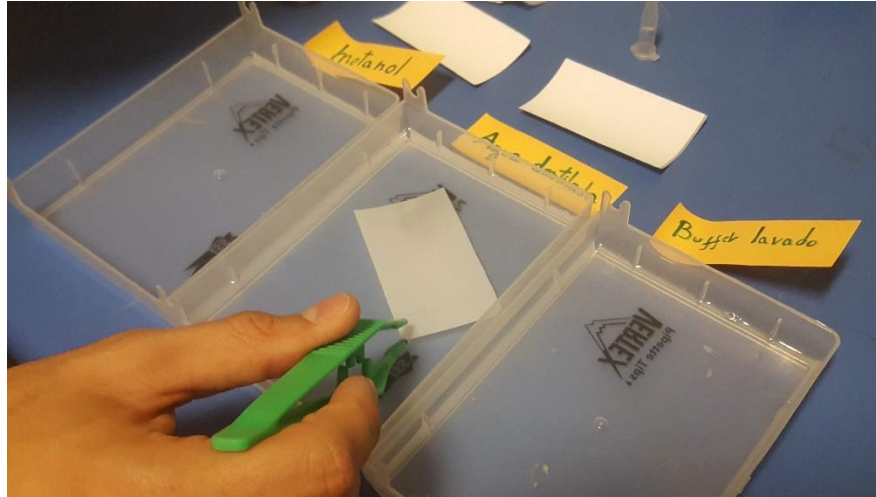


Figura 15. Recipientes con metanol, agua destilada y Buffer de lavado.

Posteriormente se verificó el estado de humedad de la membrana, esto es muy importante para la forma y deposición de la gota, para la fijación de la muestra en la membrana, y así obtener resultados adecuados en la visualización del Dot Blot. Mucha humedad o sequedad alteraban los resultados en la técnica (Figura 16).

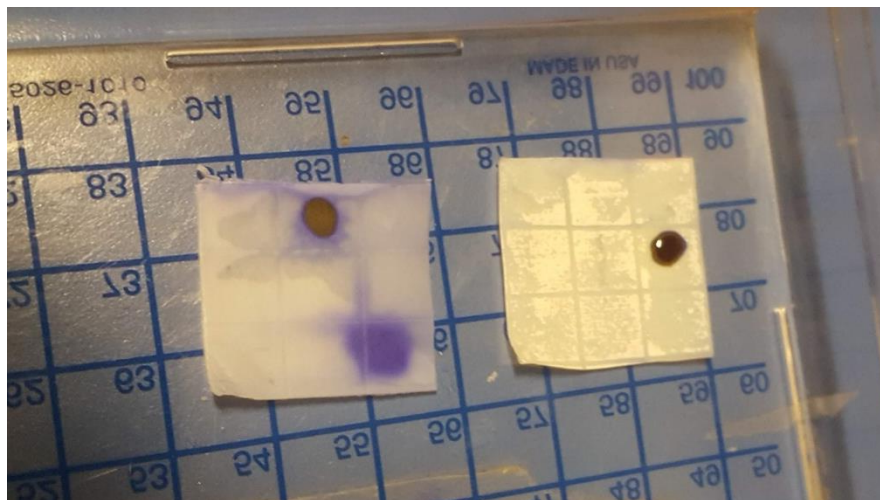


Figura 16. Humedad de membrana PVDF y forma de gota (muestra).

Al concluir estos pasos, se procede a realizar la técnica Dot Blot para determinar la expresión del péptido A β ₄₀ por parte de las plaquetas.

5.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación plaquetaria fue determinada por la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria. Un volumen de 204 μ L de las muestras con una concentración aproximada de 100.000 plaquetas/ μ L fueron pre-incubadas durante 5 minutos a 37°C. Después, fueron estimuladas por 10 minutos con TRAP-6 10 μ M. Posteriormente, se detuvo la reacción en hielo por 5 minutos. Se obtuvo una alícuota de 10 μ L que fue marcada con 1 μ L de anticuerpo anti-CD62P (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA) se incubaron durante 30 minutos en oscuridad. Después las muestras se analizaron en citómetro de flujo BD Accuri C6 (Figura16) (BD, Biosciences, EE.UU.).



Figura 16. Citómetro de flujo BD Accuri C6

Las poblaciones de plaquetas se seleccionaron mediante el tamaño (FSC) y complejidad (SSC). La lectura de la muestra se procesó hasta alcanzar 3.000 eventos por muestra. Las intensidades de fluorescencia de las poblaciones marcadas se expresaron en histogramas donde la positividad del marcaje fue establecida usando una muestra no marcada sometida a las mismas condiciones de incubación que las muestras con el anticuerpo.

5.6 CUANTIFICACION DE LA SECRECIÓN DEL PÉPTIDO A β ₄₀

La secreción del péptido A β ₄₀ fue analizado luego de la estandarización de las condiciones evaluadas para dot blot. Una vez determinadas las condiciones idóneas, se determinaron condiciones que podrían modular la liberación del péptido. Las muestras suspendidas en TAF procedentes de la estandarización se ajustaron a una concentración de 500.000 plaquetas/ μ L. Se incubaron por 5 minutos a 37°C y posteriormente sometidas a una estimulación con TRAP-6 10 μ M o suero salino. En el caso de las muestras procedentes de voluntarios, una tercera condición fue evaluada, donde las muestra fueron preincubadas con PGE-1 antes de adicionar el TRAP-6. Después de 5 minutos las muestras fueron extraídas y centrifugadas 3000 RPM durante 10 min a 4°C.

EL sobrenadante se depositó 20 μ L en una membrana de PVDF (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) previamente activada. Después la membrana fue bloqueada con leche al 5% en buffer fosfato salino con Tween-20 (PBST) por 15 minutos. Luego, la membrana fue incubada con anticuerpo anti-A β ₄₀ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente, y finalmente lavaba con buffer PBST, e incubado con anticuerpo secundario de anti- IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano (Biomada, Foster City, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de un lavado final, las proteínas específicas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia, adicionando el sustrato para la peroxidasa del anticuerpo secundario Pierce ECL Western (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Finalmente se expuso la membrana a un film fotosensible, en condiciones de oscuridad. Se analizó la intensidad de los puntos con el software ImageJ (National Institutes of Health,

Bethesda, Maryland, USA). Todas las mediciones fueron realizadas con 3 voluntarios.

6. RESULTADOS

6.1 La PGE-1 inhibe la agregación plaquetaria

Con el fin de obtener un control de la técnica a utilizar, se preincubo PRP (plasma rico en plaquetas) por 3 minutos, junto con PBS, misma solución que se encuentra para posteriormente agregar el agonista TRAP-6 (10 μ M), el cual provoca agregación plaquetaria. Con esto se obtiene un control positivo para la técnica. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Al realizar el control, se utilizó PPP (plasma pobre en plaquetas) del mismo voluntario, como blanco para la transmitancia de la luz en el equipo. Con este resultado se verificó que la técnica funciona y fue controlada.

Al utilizar la PGE-1 (5,6 μ M), se observa que inhibió la agregación plaquetaria, lo que se confirma que el compuesto es un antiplaquetario (Figura 17). Además se utilizaron distintas concentraciones de PGE-1 para establecer el rango de trabajo con que se utilizará para experimentar los siguientes pasos y técnicas correspondientes, ya que esto es fundamental ya que encontrar el rango ideal de trabajo permitirá conocer el cual es la concentración de PGE-1, inhiba completamente la agregación plaquetaria y así no aumentar la concentración y que el efecto antiagregante sea el mismo.

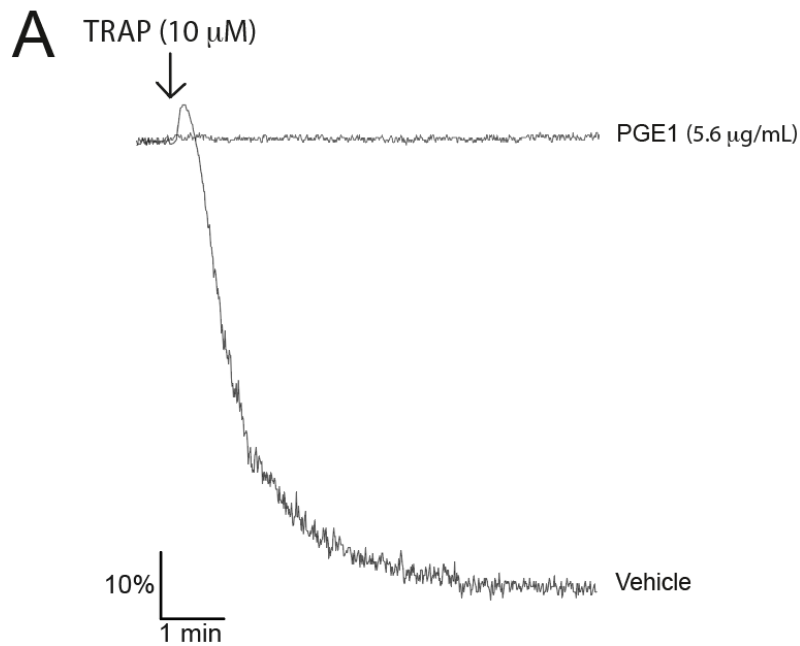


Figura 17. Agregación plaquetaria

El plasma rico en plaquetas fue preincubado y posteriormente activado en presencia de: TRAP, cual es control positivo de la técnica, y la PGE-1 (5,6 μg/mL) inhibe la agregación plaquetaria.

6.2 Expresión de liberación de péptido Aβ40 con efecto de la PGE-1.

La característica de esta técnica, que es un inmunoensayo que se utiliza frecuentemente para estudios de secreción celular. El péptido Aβ es una proteína secretada, se estandarizó los pasos para determinar la presencia de esta proteína en la secreción plaquetaria. En primer lugar, los resultados del dot blot muestran diferencias entre cada lavado de plaquetas, ya mencionado en la metodología, la cual se utilizó con diferentes condiciones: Basal y TRAP-6.

Se demostró que con dos lavados podemos ver una diferencia en la liberación (figura 18) ,con uno solo lavado se observó que todavía existe una interferencia de proteínas

inespecíficas con el anticuerpo, por posible residuos de plasma debido a la técnica, ya que no existe diferencia de las condiciones de basal, con respecto al TRAP-6 que es el agonista, lo cual se agregó una nueva centrifugación, y el resultado fue el esperado con respecto a la condiciones, ya que el se observa la diferencia entre estado basal y el activado.

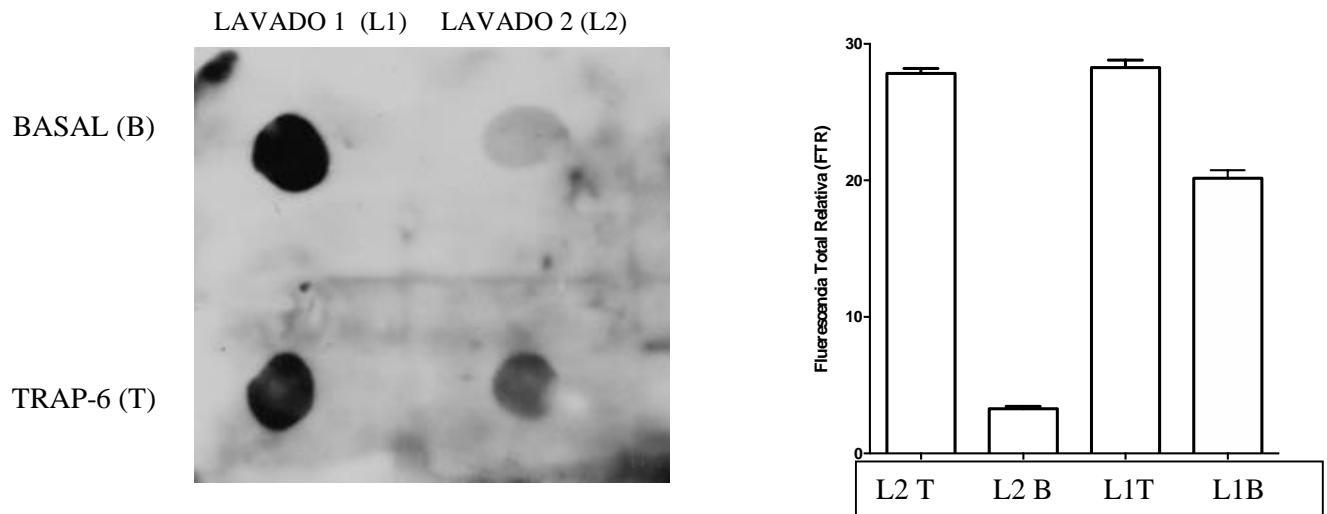


Figura 18. Expresión de péptido Aβ40 en Dot Blot. Dot blot con la diferente expresión de acuerdo al lavado plaquetario correspondiente.

Además se realizó Dot blot con diferentes condiciones (figura 19), como el control, se utilizó Trap-6, como control positivo, Forskolin, un diterpenoide que aumenta los niveles de cAMP mediante la activación de adenilil ciclasa, debido a que se han utilizado diferentes concentraciones de forskolin en estudios previos para incubar con plaquetas (0.1–100 mM) (54), se utilizó como control negativo, para asegurar que hubiera reacción con la ruta en estudio, por efecto de aumento de cAMP, se inhibe la agregación plaquetaria y se inactiva la actividad de la calpaína, esto se aseguró en estudios anteriores de Sepulveda y cols (22), con esta ruta de la calpaína bloqueada disminuye la secreción del péptido Aβ40. Con esto podemos homologar que la PGE-1 si inhibe la liberación del péptido. Además se comprobó con diferentes concentraciones de PGE-1 para observar el efecto en la liberación del péptido.

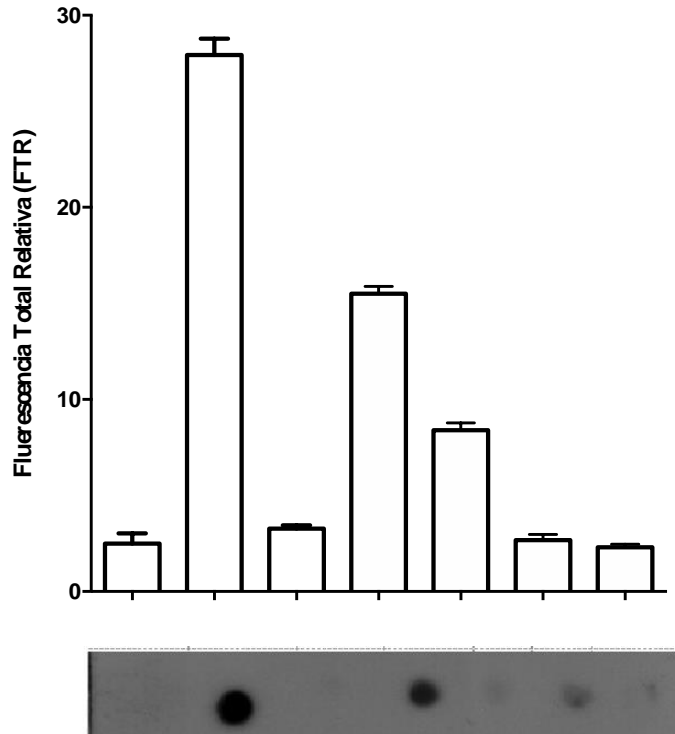


Figura 19. *Expresión de péptido A β 40 con diferentes condiciones.* B: Basal; T:Trap-6; F: Forskolin (20 μ M); PGE-1 (ug/mL) 2, 20, 50, 100.

6.3 Activación plaquetaria no es afectada por lavado adicional.

Para iniciar la técnica de citometría de flujo se ejecutó un control para los cuadrantes para identificar el marcaje de las plaquetas, se utilizó con filtros sin marcar para plaquetas y el marcaje CD61 específico de plaquetas (Figura 20).

Al activar las plaquetas con TRAP-6 (10 μ M), se puede observar un aumento de activación plaquetaria desde un 30,2% % (Figura 21A) a un 80 % (Figura 21B). Por lo tanto, el TRAP-6 (10 μ M), produce una activación plaquetaria importante en comparación con el estado basal no activado con TRAP-6 (10 μ M).

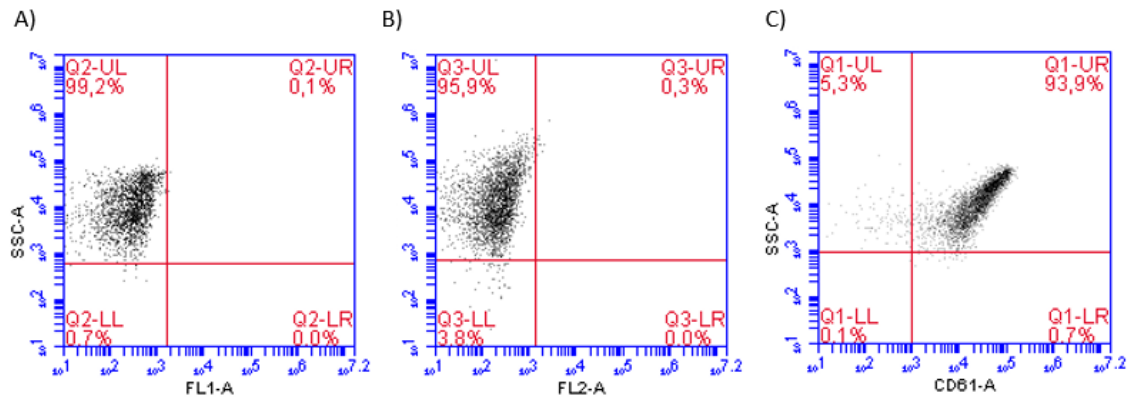
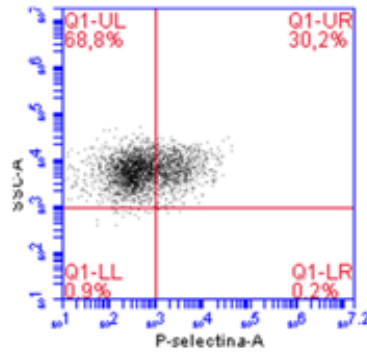


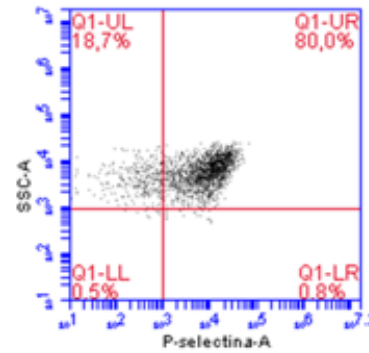
Figura 20. Controles citometría de flujo A) gráficos de puntos dividido en cuatro cuadrantes de población plaquetas sin marcaje empleando filtro FL1. B) gráficos de puntos dividido en cuatro cuadrantes de población plaquetas sin marcaje empleando filtro FL2. C) Gráfico de puntos dividido en cuatro cuadrantes, marcaje CD61 (cuadrante UR) positivo como plaquetas.

En la figura 21 se observa que con los diferentes lavados, no afecto a la activación de las plaquetas con su posterior activación con agonista TRAP-6, por lo que se concluye que con el lavado adicional que se realizó para la estandarización del dot blot, no se vio afectado por lo que se puede afirmar que el lavado 2 es representativamente igual su activación y posterior secreción de péptido A β .

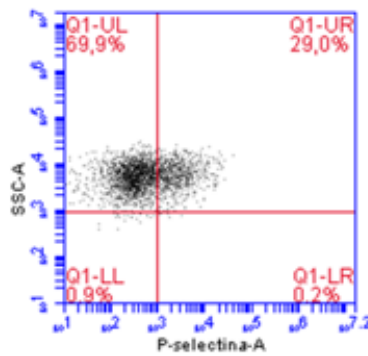
A) Basal lavado 1



B) Activado lavado 1



C) Basal lavado 2



D) Activado lavado 2

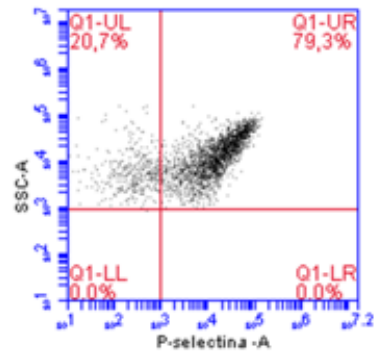


Figura 21. Expresion de P-selectina. Graficos de puntos divididos en cuatro cuadrantes A) Basal lavado 1. B) Activado lavado 1. C) Basal lavado 2. D) Activado lavado 2.

7. DISCUSION

En este estudio se pretendió demostrar *in vitro* la inhibición de la secreción del péptido A β ₄₀ en plaquetas, utilizando como inhibidor PGE-1, un antiagregante plaquetario.

La EA es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad que es la forma más común de demencia senil. En esta enfermedad, la oligomerización y la agregación de los depósitos de péptidos A β ocurren en el cerebro (55). Estos depósitos son importantes en la patogénesis de la EA que contiene principalmente 40-43 péptidos de residuos de aminoácidos autoagregados (56).

Las plaquetas son una fuente importante de péptido A β ₄₀ en el torrente sanguíneo, lo que podría contribuir a la acumulación en el cerebro y los vasos cerebrales (57). Así mismo las plaquetas activadas contribuyen a más del 90% del A β ₄₀ circulante, una vez en circulación esto puede unirse a tres posibles receptores en plaquetas como PAR1 (receptor de trombina y activador de calpaína), integrina α IIb β 3 y RAGE (31, 58). Por los mecanismos y rutas ya mencionadas en este trabajo, se concluye que la unión del péptido A β ₄₀ a las plaquetas promueve la secreción de más péptido que inicia un círculo vicioso de activación plaquetaria y sobreproducción de A β ₄₀ (31).

El TRAP-6 al ser un análogo de la trombina, es capaz de activar las plaquetas a través del receptor P2Y₁ el cual induce aún más la activación de la plaqueta, ya sea de manera autocrina, así como paracrina, a través de la liberación de ADP desde sus gránulos (51). La activación de plaquetas está mediada a través de un sistema dual de receptores acoplados a proteína G en las plaquetas de los seres humanos (59). El prototipo de esta familia, se activa y entonces se escinde su dominio extracelular amino-terminal (exodominio) en un sitio específico. Esta escisión desenmascara un nuevo terminal N que sirve entonces como un ligando atado, uniéndose intramolecularmente al cuerpo del receptor para efectuar la señalización

transmembrana (60). El efecto de la trombina, inicia diversas vías señalizadores, y activación de varias quinasas, incluyendo tirosina, serina/treonina, MAPK y PI3K (25), lo que va a provocar entonces una activación plaquetaria, con la consiguiente agregación y secreción. Dado que la activación va a ser a través de receptores acoplados a proteínas G, también se va a ver la activación de una proteína llamada calpaína (44), la cual se cree está implicada en lo que es el procesamiento de la APP y posterior liberación del péptido A β desde las plaquetas.

En el presente estudio, y de acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra que, en plaquetas tratadas previamente con PGE-1, y activadas con TRAP-6 se produce una inhibición plaquetaria de un 98 %, dado que la PGE-1 es capaz de inducir una respuesta plaquetaria que contrarresta la señalización intraplaquetaria relacionada a la activación del receptor IP. La PGE-1, se caracteriza por tener efectos antiplaquetarios, produciendo primero una producción de la adenilato ciclasa y la consiguiente elevación de cAMP (51), lo cual esto provoca un efecto negativo en la activación de la proteína calpaína, la cual la inhibe.

En plaquetas, la actividad de la calpaína, es regulada positivamente por el Ca⁺² y negativamente por el cAMP y PKA. La ruta cAMP-PKA es capaz de regular los niveles de Ca⁺², lo que se abordó en un estudio realizado por Yan, R. y cols. (2009) en donde se hace mención que la activación de PKA por cAMP inhibe la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares, y por el contrario, la inhibición de PKA conduce a la liberación de calcio desde el sistema tubular denso (61). Esto sugiere que la inhibición de PKA podría favorecer la activación de la calpaína. Por otro lado, en un estudio realizado por Ferreira, A. (2012) menciona que la fosforilación podría también estar involucrada en la regulación de la calpaína, y a pesar que el papel de la fosforilación en la actividad de la calpaína no ha sido completamente dilucidado, sugiere que la PKA va a inhibir su actividad (38).

De acuerdo con lo anterior, para asegurar que la PGE-1 actúa sobre la vía de la calpaína y validar la hipótesis de que la vía cAMP/PKA juega un papel clave en la regulación de la activación de la calpaína y la secreción de A β en las plaquetas humanas, primero, se definió

la concentración a utilizar de PGE-1, donde el rango de trabajo fue de 5,6 μM , ya que esta concentración se inhibió alrededor del 99% la agregación plaquetaria. A continuación se realizó, la técnica dot blot, donde se agregó forskolin para los ensayos, el efecto de forskolin (20 mM) sobre la activación plaquetaria se verificó luego esta concentración coincidió con la utilizada por otros autores, que intentaron inhibir la actividad plaquetaria aumentando los niveles de cAMP (22), con esto se confirma que inhibir la función plaquetaria aumentando los niveles de cAMP se disminuye o inhibe la secreción del péptido A β ₄₀ plaquetario.

Cabe destacar, además, que a la calpaína plaquetaria se le ha atribuido el producto del procesamiento de APP durante la activación plaquetaria (6). En un estudio realizado por Chen, M. y cols. (2000), apoya el hecho de que en el procesamiento normal del APP se encuentra participando la calpaína; comentando además el hecho de que muchos agentes que potencian la secreción de productos de APP como el péptido A β , activan señales de Ca⁺², mientras que otros reactivos que disminuyen los productos de APP, también inhiben la acción de Ca⁺² (34).

Ahora bien, en un estudio realizado por Canobbio, I. y cols. (2015), hace mención a un aumento de la expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas en pacientes que presentaban EA, lo que demuestra que existe secreción desde los gránulos α de las plaquetas cuando se activan, haciendo mención además, que las plaquetas una vez activadas pueden liberar péptido A β ₄₀ en circulación aumentando su concentración local, y contribuyendo a la acumulación de péptido A β ₄₀. Por ende, al haber una menor expresión de la P-selectina en plaquetas, se espera que exista una menor secreción del péptido A β ₄₀, dado que la expresión de P-selectina evidencia secreción de los gránulos alfa de las plaquetas, por ende, al haber una menor expresión, se espera que exista una baja secreción del péptido A β ₄₀. En este estudio, se pudo comprobar que en efecto, al haber una menor expresión de P-selectina en plaquetas pre- tratadas con PGE-1, la secreción que se producía del péptido A β ₄₀ en plaquetas en las mismas condiciones, se vio disminuida.

La P-selectina se transloca rápidamente a partir de gránulos alfa de plaquetas después de la activación plaquetaria (62). Se producen señales por citoquinas que van a inducir una expresión diferencial en las células endoteliales de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, así como también de P-selectina; la cual se libera de los gránulos de almacenamiento intracelular para una respuesta rápida y corta a las citoquinas (63). En este sentido se ha demostrado que el aumento de los niveles de cAMP regula la expresión de P-selectina a través de la activación de PKA (64); cuando un ligando se une a un receptor que interacciona con una proteína G constituida por una subunidad α , se activara la adenilato ciclasa, aumentando la concentración de cAMP, con la consiguiente activación de la PKA, y mediante la fosforilación de residuos específicos de serina y treonina en las proteínas, PKA regula la actividad de proteínas efectoras de esta manera se puede entender por lo tanto, la acción inhibitoria de la PGE-1 sobre la expresión de P-selectina, dado que primero es capaz de inhibir la agregación plaquetaria como se mencionaba anteriormente e inmediatamente detener la vía completa recién indicada, llevando finalmente a una disminución de la P-selectina en las plaquetas.

Es muy probable que este efecto este asociado a un aumento en los niveles de Ca^{+2} intraplaquetario, dado que esta es una condición necesaria para la activación de la calpaína; y la señalización mediada por el receptor P2Y1 es capaz de producir este efecto (65). La activación de la calpaína provocará una serie de eventos en el interior de la plaqueta mediados por proteólisis de proteínas citoesqueléticas, incluyendo la subunidad β_3 de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Ha sido propuesto que juega un papel esencial en la secreción, agregación y retracción de gránulos plaquetarios de coágulos sanguíneos unidos a fibrina (43), así como también se ha propuesto una participación en la liberación del péptido A β .

Finalmente, en este estudio la estimulación de las plaquetas con TRAP-6 indujo un aumento en la secreción del péptido A β 40. Esta secreción estaría probablemente mediada por escisión del APP vía activación de calpaína. La PGE-1 fue capaz de inhibir esta secreción probablemente vía aumento en los niveles de cAMP y consecuente aumento en la activación de PKA. Esta última puede contrarestar los efectos ligados a la señalización mediada por el

TRAP-6, como el aumento del Ca^{+2} intraplaquetario necesario para la activación de la calpaína, aunque también es posible que PKA pueda actuar por inhibición directa de la calpaína

De acuerdo a los resultados y las rutas expuestas en este trabajo, sería interesante realizar estudios con voluntarios aparentemente sanos versus pacientes con predisposición a la enfermedad de Alzheimer, ya que con esto se podría estudiar con concentraciones sugerentemente elevadas de péptido $\text{a}\beta 40$, ya que todo este trabajo experimental se llevó a cabo con voluntarios visiblemente sin patologías, y concluir que con modelos *in vivo* las rutas mencionadas están completamente en acción como la literatura lo define.

8. CONCLUSIÓN

En este estudio se pudo comprobar la inhibición de la secreción del péptido $A\beta_{40}$, utilizando un agente antiplaquetario, la PGE-1.

Tratamientos contra la EA que sean eficientes, no se han podido esclarecer aún, a causa de la falta de comprensión con respecto a lo que es la fisiopatología de la enfermedad. En este estudio, se corroboró la liberación por parte del péptido $A\beta_{40}$, quien compone las placas seniles de la EA, por parte de las plaquetas, lo que está estrechamente ligado a las anomalías vasculares de la EA.

La PGE-1, como era lo esperado, ejerció un efecto antiplaquetario a nivel de agregación plaquetaria, disminuyendo sustancialmente los porcentajes de agregación en las plaquetas tratadas. Asimismo, ejerció un efecto en la expresión de la P-selectina en la superficie plaquetaria, inhibiendo la secreción de los gránulos alfa. Por ende, al provocar una inhibición de la agregación plaquetaria, y una inhibición en la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria, la secreción del péptido $A\beta_{40}$ por parte de las plaquetas, se vio disminuida, dado que es necesario que haya una activación plaquetaria para su síntesis.

Además, en este estudio se pudo comprobar, que la actividad de la calpaína se veía disminuida, cuando se realizaba un pre-tratamiento con PGE-1, y de la misma manera se producía una disminución en la secreción del péptido $A\beta_{40}$, lo que permite inferir que la calpaína está incluida en la vía por la cual se produce la secreción del péptido $A\beta_{40}$ plaquetario.

Finalmente, la PGE-1 es un buen futuro tratamiento para evitar la síntesis del péptido $A\beta_{40}$

desde las plaquetas, y así evitar que se produzcan las placas seniles, características en la enfermedad de Alzheimer.

9. REFERENCIAS

1. Gajardo J, Monsalves MJ. Demencia, un tema urgente para Chile. *Rev Chil Salud Pública*; 2013. p. 22-5.
2. Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9.
3. Zhang W HW, Jing F. Contribution of blood platelets to vascular pathology in Alzheimer's disease.: *Journal of blood medicine*; 2013.
4. Gowert NS, Donner L, Chatterjee M, Eisele YS, Towhid ST, Münzer P, et al. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e90523.
5. Skovronsky DM, Lee VM, Praticò D. Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in human platelets. Role of cyclooxygenase and protein kinase C. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17036-43.
6. Chen M, Durr J, Fernandez HL. Possible role of calpain in normal processing of beta-amyloid precursor protein in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(1):170-5.
7. Humpel C. Platelets: Their Potential Contribution to the Generation of Beta-amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Curr Neurovasc Res*. 2017;14(3):290-8.
8. De la Rosa-Prieto C, Saiz-Sanchez D, Ubeda-Banon I, Flores-Cuadrado A, Martinez-Marcos A. Neurogenesis, Neurodegeneration, Interneuron Vulnerability, and Amyloid- β in the Olfactory Bulb of APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2016;10:227.
9. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, et al. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):648-61.
10. Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immun Ageing*. 2012;9(1):20.
11. Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, Michikawa M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem*. 2011;286(20):17536-42.
12. Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and $A\beta$ in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron*. 2014;81(4):740-54.
13. Atucha JT. Epidemiología descriptiva y analítica de la enfermedad de Alzheimer. *Real Invest Demenc*. 2011;47:16-23.
14. de Sánchez CR, Nariño D, Cerón JFM. Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer. *Acta Neurológica Colombiana*. 2010;26(3):1.
15. Cattabeni F, Colciaghi F, Di Luca M. Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2004;28(5):763-70.
16. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(9):1205-35.
17. Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014;71(4):505-8.
18. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry*. 2009;51(1):55-61.
19. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2014;129(5):756-69.

20. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(11):1505-35.
21. Ashraf J, Ahmad J, Ali A, Ul-Haq Z. Analyzing the Behavior of Neuronal Pathways in Alzheimer's Disease Using Petri Net Modeling Approach. *Front Neuroinform.* 2018;12:26.
22. Sepulveda C, Hernandez B, Burgos CF, Fuentes E, Palomo I, Alarcon M. The cAMP/PKA Pathway Inhibits Beta-amyloid Peptide Release from Human Platelets. *Neuroscience.* 2019;397:159-71.
23. Albert Cabrera MJ MPR, Gutiérrez Ravelo A, Hakim Rodríguez D,, G. PD. Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Farmacia;* 2014.
24. Mayeux R, Honig LS, Tang M-X, Manly J, Stern Y, Schupf N, et al. Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer's disease. Relation to age, mortality, and risk. 2003;61(9):1185-90.
25. Palomo I, Pereira J, Palma J. *Hematología. Fisiopatología y Diagnóstico.* Talca - Chile: EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA; 2005.
26. García Ribas G, Moreno L-S, García Caldentey J. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2014;58(7):308-17.
27. Canobbio I. Platelet Activation in Alzheimer's Disease. *Italy: Journal of Cell Signaling;* 2016.
28. Kucheryavykh LY, Dávila-Rodríguez J, Rivera-Aponte DE, Zueva LV, Washington AV, Sanabria P, et al. Platelets are responsible for the accumulation of β -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis. *Brain research bulletin.* 2017;128:98-105.
29. Canobbio I, Visconte C, Oliviero B, Guidetti G, Zarà M, Pula G, et al. Increased platelet adhesion and thrombus formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Signal.* 2016;28(12):1863-71.
30. Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, Fernandez HL. Platelets are the primary source of amyloid β -peptide in human blood. *Biochemical and biophysical research communications.* 1995;213(1):96-103.
31. Bu XL, Xiang Y, Jin WS, Wang J, Shen LL, Huang ZL, et al. Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol Psychiatry.* 2018;23(9):1948-56.
32. Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, Heizmann CW. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci.* 2008;28(20):5149-58.
33. Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P. Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (A β Os) in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
34. Evin G, Li QX. Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World J Psychiatry.* 2012;2(6):102-13.
35. Liang B, Duan BY, Zhou XP, Gong JX, Luo ZG. Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2010;285(36):27737-44.
36. Randriamboavonjy V, Fleming I. The role of calpain in diabetes-associated platelet hyperactivation. *Adv Pharmacol.* 2010;59:235-57.
37. Trinchese F, Fa' M, Liu S, Zhang H, Hidalgo A, Schmidt SD, et al. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2796-807.
38. Ferreira, A. Calpain dysregulation in Alzheimer's disease. *ISRN biochemistry;* 2012.

39. Jerónimo-Santos A, Vaz SH, Parreira S, Rapaz-Lérias S, Caetano AP, Buée-Scherrer V, et al. Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF Function by Amyloid- β Peptide is Mediated by Calpain. *Cerebral Cortex*. 2014;25(9):3107-21.
40. Ferreira, A. Calpain

dysregulation in Alzheimer's disease. ISRN

biochemistry; 2012.

41. Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*. 2007;103(6):2462-70.
42. Kuchay SM, Wieschhaus AJ, Marinkovic M, Herman IM, Chishti AH. Targeted gene inactivation reveals a functional role of calpain-1 in platelet spreading. *J Thromb Haemost*. 2012;10(6):1120-32.
43. Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti AH. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol*. 2001;21(6):2213-20.
44. Kuchay SM, Chishti AH. Calpain-mediated regulation of platelet signaling pathways. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(3):249-54.
45. Dutta-Roy AK, Kahn NN, Sinha AK. Prostaglandin E1: the endogenous physiological regulator of platelet mediated blood coagulation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989;35(4):189-95.
46. Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(20):3023-9.
47. PRIANO RM, HOCHT C, OYOLA E, CAPELLI A. Estabilidad de prostaglandina E1 fraccionada en jeringas de polipropileno. Argentina: Farmacia Hospitalaria; 2003.
48. Aykanat A, Yavuz T, Özalkaya E, Topçuoğlu S, Ovalı F, Karatekin G. Long-Term Prostaglandin E1 Infusion for Newborns with Critical Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol*. 2016;37(1):131-4.
49. Liu XL, Fan DM. Protective effects of prostaglandin E1 on hepatocytes. *World J Gastroenterol*. 2000;6(3):326-9.
50. Dutta-Roy AK, Kahn NN, Sinha AK. Interaction of receptors for prostaglandin E1/prostacyclin and insulin in human erythrocytes and platelets. *Life Sci*. 1991;49(16):1129-39.
51. Kreutz RP, Nystrom P, Kreutz Y, Miao J, Kovacs R, Desta Z, et al. Inhibition of platelet aggregation by prostaglandin E1 (PGE1) in diabetic patients during therapy with clopidogrel and aspirin. *Platelets*. 2013;24(2):145-50.
52. Iyú D, Jüttner M, Glenn JR, White AE, Johnson AJ, Fox SC, et al. PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011;94(1-2):9-16.
53. Miranda-Ulloa E, Sandoval-Ahumada R, Ayala E, Vásquez-Ampuero J. Evaluación de las pruebas DOT BLOT y aglutinación de látex para el diagnóstico de cisticercosis en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2014;31:297-301.
54. Kariya T, Morito F, Sakai T, Takahata K, Yamanaka M. Effect of forskolin on platelet deaggregation and cyclic AMP generation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1985;331(1):119-21.
55. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81(2):741-66.
56. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(3):534-9.

57. Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2009;5(1):18-29.
58. Donner L, Falker K, Gremer L, Klinker S, Pagani G, Ljungberg LU, et al. Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin alphaIIb beta3-induced outside-in signaling and clusterin release. *Sci Signal*. 2016;9(429):ra52.
59. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11023-7.
60. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
61. Yan R, Wang Z, Yuan Y, Cheng H, Dai K. Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. *Arch Biochem Biophys*. 2009;485(1):41-8.
62. Libersan D, Rousseau G, Merhi Y. Differential regulation of P-selectin expression by protein kinase A and protein kinase G in thrombin-stimulated human platelets. *Thromb Haemost*. 2003;89(2):310-7.
63. Ghera P, Hooft van Huijsduijnen R, Whelan J, Cambet Y, Pescini R, DeLamarter JF. Inhibition of E-selectin gene transcription through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 1994;269(46):29129-37.
64. Fuentes E, Pereira J, Mezzano D, Alarcón M, Caballero J, Palomo I. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. *PLoS One*. 2014;9(11):e112741.
65. Puri RN, Zhou FX, Bradford H, Hu CJ, Colman RF, Colman RW. Thrombin-induced platelet aggregation involves an indirect proteolytic cleavage of aggregin by calpain. *Arch Biochem Biophys*. 1989;271(2):346-58.

