

302927



**UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO**  
**ESCUELA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**(INCORPORADA A LA UNAM)**

5  
2ej

## FALLA DE ORIGEN

**ASPECTOS BIOQUIMICOS Y METODOS DE CUANTIFICACION  
DE LA MONOAMINO-OXIDASA PLAQUETARIA.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**MARICELA GARCIA BARRERA**

---

**FALLA DE ORIGEN  
EN SU TOTALIDAD**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A LA Q.F.B. JULIA MORENO AGUILAR.

Mi admiración y agradecimiento por su colaboración en la realización de este trabajo.

A LA M. EN C. ALICIA CASTILLO MARTINEZ.

Todo mi respeto y agradecimiento por la excelente asesoría en la elaboración del presente trabajo.

**CON AMOR ESPECIAL A**

**MIS PADRES:**

**RAUL Y PETRY**

Como testimonio de gratitud por la oportunidad y el apoyo para lograr esta meta que es para mi la mejor de las herencias.

A MIS HERMANOS

LUZ MA. Y RAUL

Con todo mi cariño y admiración por  
el apoyo que siempre me han  
demostrado y por enseñarme a ser un  
gran ser humano.

A HELEN

Por tu ejemplo de mujer y madre.

A MIS SOBRINOS

VERO, ALEX, BONY Y EDEL

Por estar conmigo en cualquier momento y sobre todo, ser mis mejores amigos.

A XIADANI

Por la ternura que solo un bebé puede inspirar.

**A MANUEL**

Por todo el apoyo sentimental y moral necesarios para motivarme a concluir con esta meta.

Por tu amor que me ha permitido conocer la felicidad, y ser la mejor recompensa que Dios me pudo dar.

**A MIS TIOS Y PRIMOS**

Con respeto y cariño.

**A DIOS**

Por ser la luz que ilumina mi vida  
y me ha permitido logra esta meta.



## INDICE

	PAGE.
1. INTRODUCCION	
1. - GENERALIDADES	1
2. - PRODUCCION DE PLAQUETAS	6
2.1. MORFOLOGIA DE LAS PLAQUETAS	10
2.2. ULTRAESTRUCTURA	12
2.3. CONSTITUYENTES DE LA MEMBRANA	19
2.4. COMPOSICION DE LAS PLAQUETAS	21
2.5. FUNCIONES DE PLAQUETAS	28
3. ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA MAO	30
3.1. DISTRIBUCION EN TEJIDOS	32
3.2. PROPIEDADES DE LA MAO MITOCONDRIAL	32
3.3. ISOFORMAS DE MAO	34
3.4. PAPEL FISIOLÓGICO DE MAO	38
4. REVISION DE LOS METODOS DE SEPARACION DE PLAQUETAS	40
5. TECNICAS DE SEPARACION	42
5.1. METODO DE CORASH	42
5.2. METODO DE CORASH	45
5.3. METODO DE FRIEDHOFF	47
5.4. METODO DE WISE	49
5.5. METODO DE VARGAS	51
5.6. METODO DE JACKMAN	53

5.7. - METODO DE RAMESH.....	55
5.8. - METODO DE FRITZ.....	58
5.9. - METODO DE LLENARES.....	57
6. - METODO DE MONOAMINO-OXIDASA.....	59
6.1. - METODO DE JACKMAN.....	60
6.2. - METODO DE KRAJL.....	62
6.3. - METODO DE MURPHY.....	64

II. DISCUSION

III. CONCLUSION

BIBLIOGRAFIA

## I. INTRODUCCION.

Las catecolaminas son aminas derivadas del aminoácido esencial fenilalanina, estas juegan un papel de gran importancia en la realización de diversas funciones metabólicas del organismo.

Estas sustancias son sintetizadas por un grupo celular especializado que deriva del neuroectodermo y constituye la división simpática del sistema nervioso autónomo. Las catecolaminas representan a un grupo de mensajeros químicos extraordinariamente versátil. Así se ha demostrado su participación en la transferencia de información simpática actuando como neurotransmisores, moduladores neuronales o como hormonas. Por otra parte se reconoce que el dolor, el calor, el frío, la tensión emocional, la hipoglucemia, las hemorragias y la asfixia, así como numerosos fármacos y sin duda otros factores aún no definidos estimulan la liberación de catecolaminas a la circulación sistémica y provocan gran parte de los efectos observados durante la llamada reacción de alarma o estrés. Además se conocen varios trastornos clínicos que cursan con producción o liberación excesiva de estas aminas, por ejemplo; la enfermedad de Parkinson en la que existe deficiencia en la síntesis y/o liberación de catecolaminas.

El metabolismo de las catecolaminas se resume en dos fases: a) La Biosíntesis y b) La Degradación.

### a) Biosíntesis.

La síntesis se inicia con la entrada a las células del aminoácido L-tirosina y su hidroxilación para formar dihidroxifenilalanina, esta es el sustrato para una descarboxilasa inespecífica que cataliza su conversión a 3-4 dihidroxietilamina conocida como dopamina. La cual se considera como un posible neurotransmisor en el cerebro y la hidroxilación produce la 2-amino,1-3,4 dihidroxifeniletanol o noradrenalina (47).

Mientras que los primeros pasos enzimáticos de la síntesis de noradrenalina se realizan en el citoplasma, la síntesis de noradrenalina se realiza en el gránulo cromafín donde se encuentra (DBH) dopamina-β-hidroxilasa y la enzima (PNMT) feniletanolamina-N-metiltransferasa, para formar la 3,4 dihidroxifenil-2-metilaminoetanol o adrenalina (47).

BIOSINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS  
( figura 2 )

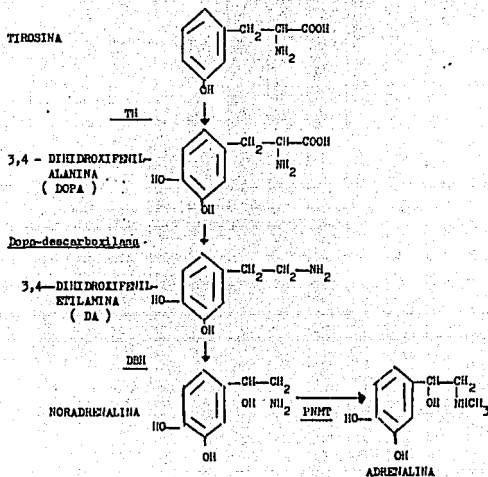


Fig. 3.  
Representación de la biosíntesis de la tirosina.

b) Degradación.

En los mamíferos las enzimas de mayor importancia en la degradación metabólica de las catecolaminas son: la catecol-o-metiltransferasa (COMT) y la monoamino-oxidasa (MAO).

La COMT es relativamente inespecífica y cataliza la transferencia del grupo metilo de diversos compuestos del catecol, es abundante en el riñón y el hígado. Se ha sugerido que la COMT funciona extraneuronamente y su acción produce entre otros los catebolitos de las catecolaminas (46).

Por otro lado la MAO es una enzima que convierte a las catecolaminas en sus metabolitos desaminados transformandolos a sus aldehidos correspondientes. Este intermediario aldehido es metabolizado con rapidez, por lo general, en oxidación producida por aldehidodeshidrogenasa y así convertido al ácido correspondiente. En algunas circunstancias, el aldehido es reducido a alcohol o glicol mediante la aldehidoreductasa. En el caso de la noradrenalina la reducción del aldehido parece ser la vía favorecida del metabolismo. La MAO es una enzima localizada fundamentalmente en la membrana exterior de las mitocondrias y en menor cantidad en los microsomas.

Por lo general se considera que aunque la mayor proporción de esta enzima es de hecho extraneuronal, la enzima intraneuronal es la que parece ser la más importante en el metabolismo de las catecolaminas (19).

La dopamina parece ser el mejor sustrato para la MAO que la Adrenalina o la Noradrenalina. Diariamente grandes cantidades de metabolitos desaminados de la dopamina son excretados en la orina del humano. La MAO constituye una enzima catabólica exclusiva de las catecolaminas ya que desamina mediante oxidación a otras aminas biógenas como la triptamina, 5-hidroxitriptamina y la tiramina, además se ha sugerido que su acción se limita a las aminas que se hallan presentes en forma libre en el exoplasma.

Dicho proceso metabólico es importante para mantener el equilibrio del organismo por lo que se ha originado un gran interés por esta enzima ya que es una de las mejores enzimas del catabolismo de aminas biógenas en cerebro, y se ha visto que juega un papel muy importante en la regulación de los niveles intra-neuronales de monoaminas. Es por esto que existe una posible correlación de su actividad con diversos padecimientos psíquicos, en donde se ha localizado un desorden en los niveles enzimáticos como por ejemplo esquizofrenia (6,51,66,69,72,81,82), ansiedad (4), depresión (17,25,50,61,63,67), entre otros.

Como consecuencia de las dificultades inherentes, al estudio del sistema nervioso central (SNC) en el hombre, se ha recurrido al estudio de animales y de elementos periféricos, consistentes en sustancias y estructuras extraneuronales, como modelo de investigación; son pocos los estudios realizados con tejido cerebral humano, y en éstos, además de ser escasos, generalmente no se utiliza tejido sano y fresco (71,83).

En 1951 Rand y Reid reportan que las plaquetas contienen una sustancia vasoactiva llamada serotonina (5-hidroxitriptamina 5-HT) pero al mismo tiempo esta monoamina no se muestra como neurotransmisor. La primera conexión con las plaquetas y psiquiatría ocurre en 1960, donde Marshall y col. reportaron que pacientes que recibieron imipramina como inhibidor, han disminuido los niveles de serotonina en plaquetas (12).

Las plaquetas transportan monoaminas. Subsecuentemente se ha demostrado que las plaquetas humanas tienen numerosas propiedades en común con las neuronas monoaminérgicas del SNC, algunas de ellas se enumeran a continuación (21,27,80):

- 1) Presencia del sitio de unión a diversos neurotransmisores.
- 2) Fenómeno de membrana en común.
- 3) Presencia de la enzima Monoamino-oxidasa (MAO).
- 4) Evidencias de que pudieran tener un origen genético común.

Como consecuencia de las similitudes de la plaqueta con las neuronas monoaminérgicas, la intervención de la MAO en el metabolismo de las aminas neurotransmisoras involucradas, con fenómenos de psicopatologías, el efecto psicotrópico de los fármacos, la actividad de la MAO plaquetaria se ha propuesto como un marcador biológico (22,41,50,63).

El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una investigación bibliográfica para determinar el método óptimo para el aislamiento de plaquetas y la cuantificación de la actividad de dicha enzima.

## 1.- GENERALIDADES.

Dada la importancia biológica de MAO, conviene recordar brevemente el desarrollo de los hechos más sobresalientes de dicha enzima.

En 1928 Hare fue el primero en aislar la monoamino-oxidasa (MAO) determinó que proviene de la histaminasa la cual utiliza como sustrato principal a la histamina (32).

Posteriormente en el año de 1952 se realizó un estudio en rata, y se encontró que existen varios fragmentos de la MAO en donde dos terceras partes de la actividad enzimática están presentes en la mitocondria y una tercera parte en la fracción microsomal (76,77).

Werler y Roewer (1952) reportan la separación de la enzima de algunos órganos animales que son capaces de oxidar algunas aminas alifáticas y aromáticas; Allen y Hegard (1943) prueban un gran número de sustratos monoamínicos contra la enzima de diferentes especies y establecen marcadas diferencias en la proporción de oxidación. Satake (1955) sugiere que la MAO plaquetaria puede representar un grupo de enzimas a las cuales cada miembro tiene una singular diferencia en sustratos específicos; menciona también que la constitución exacta de esos grupos puede variar de tejido en tejido.

En el trabajo de Herdegg y Herlbron (1961) relativo a la multitud de MAO en la cinética de inhibición de la oxidación de 5HT (5-hidroxitriptamina) y tiramina en mitocondria de hígado de rata, concluyen que dos sustratos son probables de oxidarse con dos enzimas variantes. Resultados similares son reportados por Gorkin (1966), Youdim y Sourkes (1965) y Squires (1968).



La enzima mitocondrial fue solubilizada y purificada en hígado de rata, (Youdim y Sourkes 1966), hígado de res (Nara, Gómez y Yasunobu 1966), hígado de puerco (Erwin y Hellerman 1967) y cerebro de puerco (Trypton 1968).

Youdim y Sandler (1967) lograron separar por lo menos tres bandas con actividad enzimática en mitocondria a partir de hígado de rata y dos en placenta humana en PAGE. (electroforesis en gel de poliacrilamida). Posteriormente, Kim y D'loro (1968) reportaron la separación de MAO en cerebro e hígado de rata usando PAGE. Se ha confirmado su presencia en hígado de res (Gómez, Igave, Hloepfer y Yasunobu 1969; collin, Sandler, Williams y Youdim 1970), en hígado de humano y rata (Collins, Youdim y Sandler 1968 y 1970), en cerebro de pollo (Shih y Eiduson 1969) Hashimoto y Okuyama 1970), en zarpas de sapo (Xenopus laevis y Baker 1971), en útero de rata (Collins y Southgate 1970), en médula adrenal de res (K.F. Trypton, M.B.H. Youdim e I.P.C. Spires en preparación) en hígado de Bovino (Hartman, Kloefer y Yasunobu 1969), en cerebro de cerdo (Trypton 1968; Trypton y Spires 1968), en intestino delgado de mono (Murali y Radhakrishnan 1970), y en plaquetas de humano (Collins y Sandler 1971). La enzima aparece homogénea exhibiéndose sólo una singular banda de actividad en geles nativos de poliacrilamida (32).

Con base a toda la información acumulada, se ha propuesto que la actividad de la MAO plaquetaria puede ser un marcador biológico relacionado con diferentes rasgos de la personalidad y con algunos cuadros psicopatológicos. Por lo que la determinación de un método óptimo para la cuantificación de la actividad de esta enzima, es importante, ya que nos permitirá detectar la vulnerabilidad a trastornos psiquiátricos (40,41,42,48).

Subsecuentemente se ha demostrado que las plaquetas humanas tienen numerosas propiedades en común con las neuronas monoaminérgicas centrales. Sin duda el aspecto clínico más estudiado en plaquetas sanguíneas es el contenido de monoamino-oxidasa (MAO). Los estudios realizados por Nies et al. (1973) en gemelos monocigóticos y dicigóticos como controles indican que la enzima se puede encontrar por debajo de los valores de control (12,60).

Las teorías biológicas proponen que la enfermedad mental es básicamente un estado biológico alterado, y que factores como la neuroanatomía, la genética o la bioquímica son los determinantes primarios de los síntomas psíquicos. Según esto, dichos síntomas estarían producidos por causas externas que interferirían el psiquismo normal, produciendo irregularidades biológicas en forma de deficiencias, disfunciones y enfermedades.

Aunque este planteamiento no es, novedoso en medicina, el hecho de referir los trastornos psíquicos a una casualidad biológica somática a la interpretación de esos trastornos, ha encontrado siempre detractores. Pero es a partir de los actuales conocimientos sobre los mecanismos de la herencia y los avances recientes en el campo de la neuroquímica cuando estas teorías han adquirido relevancia significativa para algunas enfermedades mentales (40,41).

Todo ser viviente se desarrolla según dos parámetros: lo heredado y lo adquirido. Y ambos se complementan de tal manera que, si bien se admite que los factores hereditarios juegan un papel importante en la forma de ser del individuo, las disposiciones genéticas pueden ser en muchos casos sustancialmente modificadas por los factores ambientales.

Los estudios genéticos en psiquiatría comenzaron a realizarse de modo sistemático a principios del siglo XX, siendo E. Rudin el primero que investigó sobre la incidencia de los trastornos mentales en familiares de enfermos psíquicos. Otros autores, como Langer, Luxenburger, Kallman,

Slater, Zerbin-Rudin, etc., han ido desarrollando las aplicaciones de la genética clínica al campo psiquiátrico. De la extensa variedad de métodos utilizados, los estudios sobre gemelos han servido para valorar el papel de la herencia en ciertas enfermedades psíquicas. Los estudios familiares, por su parte, aportan información sobre las formas de transmisión hereditaria y el cálculo de riesgo a enfermar. Por último, los estudios epidemiológicos o citogenéticos y las recientes investigaciones bioquímicas a nivel molecular han enriquecido notablemente la genética psiquiátrica (22,41,50,63).

Algunos hechos corroboran estas afirmaciones. En primer lugar, una serie de anomalías cromosómicas que determinan trastornos psíquicos, como por ejemplo la enfermedad de Turner, el síndrome de Dawn (mongolismo), etc. En segundo lugar, todos los estudios coinciden en que existe una transmisión hereditaria de la esquizofrenia (modalidad recesiva poligénica) y de la psicosis maniaco depresiva (modalidad dominante poligénica). Además, sabemos que determinadas condiciones genéticas producen modificaciones enzimáticas y metabólicas causantes de retraso intelectual (fenilcetonuria). Por último, se conocen los riesgos de enfermedad en la población general o en familiares, para ciertas psicosis (42,48).

La hipótesis bioquímica de los trastornos psíquicos están adquiriendo cada vez mayor realce, sustentadas unas veces por conocimientos empíricos, y otras, por investigaciones neurofisiológicas o neuroquímicas. Los llamados neurotransmisores juegan aquí un papel muy importante, porque se comportan como mensajeros en la transmisión de los impulsos nerviosos. Estos neurotransmisores se sintetizan en las neuronas y después se almacenan en ellas. Cuando la neurona es estimulada, se activa la liberación de neurotransmisores, que a su vez estimulan a la célula nerviosa inmediata. Las principales sustancias que actúan como neurotransmisores son las catecolaminas, la serotonina y la acetilcolina. Existen además otras sustancias, como la histamina, sustancia F, TRH, etc., que hasta la fecha han sido escasamente estudiadas.

Sobre esta base se han establecido formulaciones respecto al origen bioquímico de la esquizofrenia y de las psicosis afectivas (depressiones endógenas). En el caso de la esquizofrenia, la investigación está dominada por dos hipótesis: una sugiere que la enfermedad se debe a un trastorno del metabolismo cerebral de las catecolaminas o de la serotonina; otra propone que es consecuencia de una mayor actividad de una catecolamina: dopamina. Sin embargo, se dispone de pocos datos directos que apoyen tales hipótesis, y lo más probable es que la esquizofrenia sea debida a una alteración del equilibrio entre los diversos neurotransmisores, sin que conozcamos todavía cual es el punto de partida.

En el caso de la enfermedad afectiva también se admiten sustratos biológicos, que en la depresión clínica se asocia a un disminución absoluta o relativa de catecolaminas, especialmente noradrenalina, y que en los estados maníacos a un exceso. Estos y otros hallazgos son bastante esperanzadores y están aportando nuevas perspectivas diagnósticas y terapéuticas.

En la década de los noventa el diagnóstico de la depresión se hace cada vez más preciso gracias a que se dispone de métodos bioquímicos paralelos al diagnóstico clínico (21,27,80). El interés en el estudio fisiológico de las plaquetas, se ha incrementado específicamente con el uso de estas células para explorar su papel en la patología de un amplio espectro de enfermedades en el humano.

## 2.- PRODUCCION DE LAS PLAQUETAS

### MEGACARIOCITOS.

Las plaquetas se producen por fragmentación de células gigantes multinucleadas llamadas megacariocitos cuya proporción es de menos del 1 % de todas las células nucleadas de la médula ósea. En el feto los megacariocitos aparecen primeramente en el saco vitelino y después en el hígado y en el bazo posteriormente. A los tres meses aparecen en la médula ósea (26), lugar donde se encuentran casi exclusivamente después del nacimiento.

Gran parte de nuestros conocimientos acerca de la proliferación de los megacariocitos deriva de los estudios en ratas, ratones y conejos, pero la secuencia de maduración de estas células en el hombre parecen cualitativamente similar a la de otras especies de mamíferos. Los megacariocitos proceden de una célula multipotencial capaz de diferenciarse en las líneas eritrocítica, mielocítica, linfocítica y megacariocítica (73,78). Puede haber un grupo de células "comprometidas" intermedias entre las células germinales y los megacariocitos (4). El miembro que primero se reconoce de la serie, es el megacarioblasto, inicialmente es de 20 a 30  $\mu$ m de diámetro con un citoplasma basófilo y un núcleo ligeramente irregular con una cromatina laxa y a veces reticular, con varios nucleolos. Los megacarioblastos maduros pueden contener hasta 32 nucleolos pero el citoplasma permanece laxo e inmaduro. A medida que la maduración progresa, el núcleo se hace más lobular y picnótico; el citoplasma aumenta en cantidad y se hace más acidófilo y granular. Las células más maduras pueden presentar la aparición de liberar plaquetas hacia la periferia. Normalmente menos del 10% de los megacariocitos están en fase blástica y más del 50% son maduros. La clasificación arbitraria más comúnmente aplicada a la serie megacariocítica es: megacarioblasto para la forma más joven; promegacariocítico o megacariocítico basófilo para la forma intermedia y megacariocito maduro (acidófilo, granular o productor de plaquetas) para la última forma.

PLAQUETAS

FORMACION PRECURSORA

SERIE MEGACARIOCITICA

MEDULA OSEA

MEGACARIOBLASTO

PROMEGACARIOCITO

MEGACARIOCITO

Fig. 1.

La figura nos muestra la evolución de los megacariocitos (plaquetas).

## MEGACARIOPOYESIS.

Se llama así a la formación de megacariocitos (mega-grande, karyon- núcleo, cyton- célula), células con núcleos gigantes, precursoras de las plaquetas, a las que dan origen por medio de liberación de fragmentos de citoplasma, que captan los capilares sinusoidales de la médula ósea y así llegan a la circulación en forma de plaquetas. ( ver figura No.2).

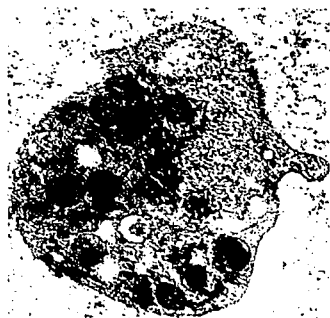
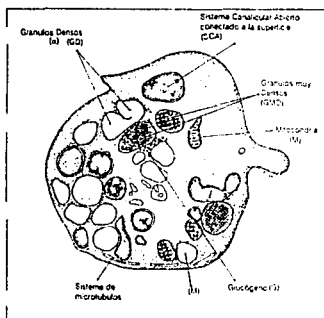


fig Ultraestructura de una plaqueta como se observa mediante microscopio electrónico de transmisión. Cortesía Dr. Jesús Machado-Salas, ENEP-Itacala, UNAM.

Los megacariocitos constituyen menos del 1 % de las células nucleadas de la médula ósea normal (fig. 1), son células gigantes, cuyo tamaño varía de 30 a 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, y los núcleos gigantes resultan de la poliploidia que ocurre en la célula, por duplicación de los cromosomas durante la mitosis, sin que haya separación de la membrana nuclear. Además de núcleo gigante, los megacariocitos tienen gran cantidad de citoplasma, el núcleo es de color azul intenso, contienen numerosos nucleolos, la forma puede ser irregular lobulada u ovoidea, lo cual puede darle aspecto multinucleado, por ello pueden confundirse con células gigantes de cuerpo extraño, que se forman por fusión de macrófagos o con osteoclastos que están en las superficies óseas, ya que ambos son células multinucleadas. El citoplasma contiene abundantes granulos que aparentemente se forman en el aparato de Golgi. La célula tiene forma irregular con muchos pseudópodos. La célula precursora del megacariocito (prémegacariocito) es capaz de dividirse sin que se lleve a cabo la poliploidia del núcleo, y así dar origen a más megacariocitos para mantener el número constante en médula ósea (45,3).

Aunque la médula ósea es el sitio principal de formación de plaquetas en el hombre, se han encontrado megacariocitos en pulmones; recientemente se ha demostrado que no se originan ahí, pero se pueden producir plaquetas.

Se ha descrito un factor humoral llamado trombopoyetina, que controla los procesos que intervienen para aumentar la formación de las plaquetas. Las plaquetas se forman por fragmentación de los pseudópodos. Las regiones periféricas, se dividen cada vez en más compartimentos, que incluyen granulos, hasta quedar rodeados por membranas completas, es entonces cuando los compartimentos se pueden separar fácilmente de la célula original, sin rotura de plasmalema celular dando origen a las plaquetas. Una tercera parte de las plaquetas se encuentran en el bazo y las otras dos terceras partes circulando. Su vida media es entre 9 y 12 días y los sitios en que más son destruidas o utilizadas aparentemente son hígado y bazo (70).

FALLA DE ORIGEN

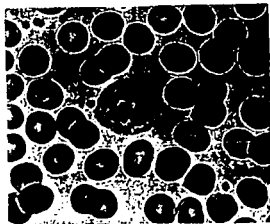


## 2.1.- MORFOLOGIA DE LAS PLAQUETAS.

También llamadas trombocitos o troboplastides son pequeños cuerpos no nucleados, granulares, en forma dediscos que miden de 0.5 a 3.0  $\mu\text{m}$  y que circulan en número de 200 000 a 400 000 por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>). Su morfología depende de varios factores: método por medio del cual son examinadas, anticoagulante utilizado y temperatura entre otros. En preparaciones húmedas, la plaqueta es incolora, moderadamente retráctil y de forma elíptica o helicoidal, en campo oscuro son traslucidas y tienen contorno definido. Con el microscopio de contraste de fases (en microcinematografía), se observan vacuolas contráctiles y vesículas de pinocitosis. En frotis teñidos con Romanovsky, son redondas, avales, alargadas con granulos azurófilos en su citoplasma hialino azul claro, que tiende a ocupar en centro de ellas (70). Ver figura 3.



Microfotografía (x 100) de un frotis de médula ósea roja humana teñido con colorante tipo Romanowski, con un megacariocito de gran tamaño y varios núcleos



Microfotografía (x 100) de un frotis normal humano en la que se observan algunas plaquetas teñidas con colorante Romanowski.

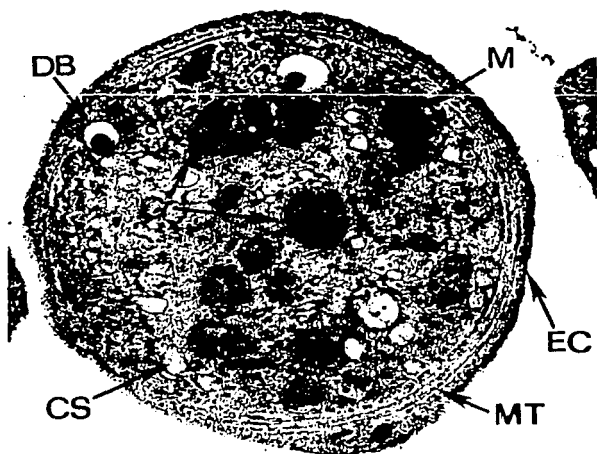


Fig. . Plaqueta procedente de una muestra de plasma citratado rico en plaquetas (C-PRP) de una persona normal, fijada con glutaraldehído ósmico e incluida en plástico. La célula está cortada a nivel de su circunferencia mayor, con lo que se corta la banda marginal de microtúbulos (MT) a lo largo de la mayor parte de su curso. La zona periférica consta de una capa externa (EC), membrana y área submembranosa. Como el sistema canalicular (CS) se continúa con la superficie, se extiende desde la periferia hasta el interior de la plaqueta. La zona de sol-gel forma la matriz densa de la plaqueta. Los microtúbulos circunferenciales (MT) son las únicas fibras claramente delimitadas de esta zona en las células inalteradas. La zona de organelos consta de muchos gránulos (G), algunas mitocondrias (M) y unos pocos cuerpos densos (DB) ( $\times 39.000$ ).

## 2.2.- ULTRAESTRUCTURA.

Con microscopio electrónico, se observan pequeños cuerpos sin núcleo, de forma discoide, constituido por tres grandes zonas, cada una relacionada con un espectro específico de su función. La zona periférica con la adhesión, la segunda llamada de sol-gel directamente con la contracción y la tercera o zona de organitos que lleva acabo las funciones de secreción de factores; cada una de estas se describirá a continuación (fig.5).

**ZONA PERIFERICA.** Durante la formación del coágulo, la adhesión de las plaquetas a los sitios lesionados de los vasos y entre sí, constituye la base para la formación del futuro coágulo hemostático. Al mismo tiempo la plaqueta se torna adhesiva, liberando los elementos químicos que aumentarán la agregación plaquetaria. En todos estos fenómenos interviene de manera importante la zona periférica de las plaquetas, ya que provee los elementos para las interacciones químicas que genera la respuesta plaquetaria, el sitio físico para que se adhiera la célula y dispere el mecanismo que transfiere el estímulo, de fuera de la célula al interior de la plaqueta. Esta zona incluye tres elementos: capa externa, membrana y submembrana.

a) la capa externa también denominada atmósfera, o tunica plaquetaria es la que se encuentra en contacto directo con el plasma circulante; esta compuesta por mucopolisacáridos y glucoproteínas, además de ATPasa dependiente del  $Mg^{++}$ . Es el sitio de adhesividad de la plaqueta y permanece antes, durante y después de la agregación, pero los mecanismos y factores químicos que hacen adhesiva a la plaqueta, aun no se han aclarado (Ver figuras 6, 7 y 8).

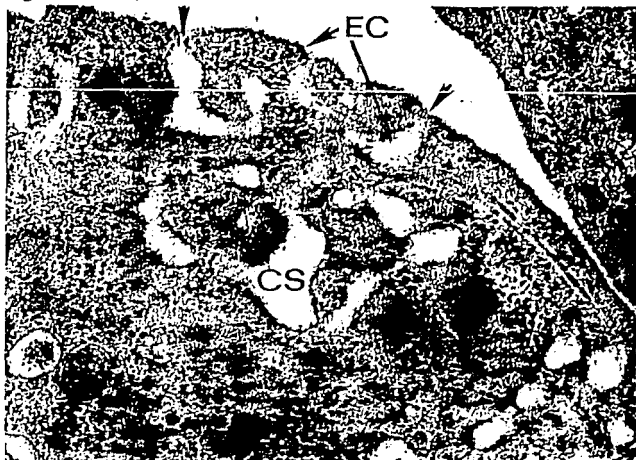


Fig. Area periférica de una plaqueta a gran aumento. El material de la capa exterior (EC) cubre la membrana unitaria de la superficie celular y los límites del sistema canalicular (CS). Las flechas indican los sitios de comunicación entre el CS y la periferia de la superficie de cada plaqueta (x41,500).

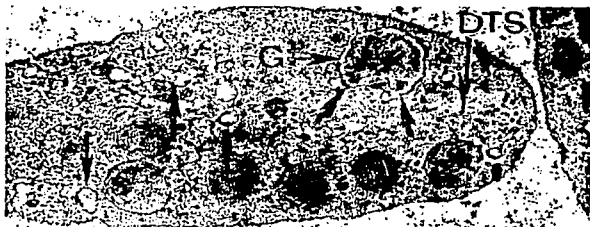


Fig. 1. Plaqueta discóide procedente de una muestra de plasma citratado rico en plaquetas (C-PPP) incubado con dióxido de torio. Las pequeñas partículas electrónicamente densas penetran en los canales abiertos (flechas) del sistema canalicular y son transferidos a algunos gránulos plaquetarios. El gránulo que contiene partículas de torio está en una fase temprana de transformación en cuerpo denso. En esta célula son evidentes elementos del sistema tubular denso (DTS) asociados con microtúbulos circunferenciales. La sucesión de la captación del torio en los canales abiertos, su transferencia a los gránulos intactos y la conversión de los gránulos en cuerpos densos puede explicar la captación y almacenamiento de la serotonina en las plaquetas (x33.200).



Fig. 2. Plaquetas de una muestra de plasma citratado rico en plaquetas (C-PPP) agregadas en ADP y teñidas durante la fijación con rojo ruteno (colorante de mucopolisacáridos). Este agente tñe la capa exterior y el material intercelular (flechas) y entra en el sistema canalicular plaquetario (CS). La sustancia de los cuerpos densos (DB) está en íntima relación con los canales teñidos y muchas veces se confunde con ellos. Los gránulos también descarpan en esos canales y son rojo ruteno positivos. El sistema de canales y los espacios intercelulares pueden ser la más importante vía de secreción de constituyentes endógenos plaquetarios (x38.100).

b) Membrana: La porción media de la zona periférica es parte de la membrana plasmática de su célula antecesora, y es esencial para la integridad de la plaqueta, pero además en la formación y como proveedor de un lípido que sirve como activador en la coagulación, aunque esto último no se ha comprobado (Ver figura 3).



Fig. 1237. Porción de una plaqueta hinchada por agua destilada antes de montarla completamente y teñida con ácido fosfotúngstico. La membrana celular (CM) y las membranas de gránulos (GM) son relativamente transparentes electrónicamente. Los cuerpos densos (DB) son electropacos. Masas de microfibrillas (MF) llenan la matriz plaquetaria. Las fibras de 50 Å son indistinguibles de las subfibrillas de  $\alpha$ -actinina (AM) y de los filamentos de la submembrana. Los elementos del sistema canalicular (CC) también son electroparecidos en las preparaciones completamente montadas (x71,700). (Cortesía de Blood)

c) submembrana: Constituida por una serie de filamentos periféricos finos paralelos a los microtubulos, forman una banda circunferencial por debajo de la membrana, probablemente ayudan a mantener la forma de disco de la plaqueta, además participan en la formación y estabilización de pseudópodos y ayudan a la retracción de las proyecciones de la superficie durante la agregación.

**ZONA SOL GEL:** Se le ha denominado hialoplasma o hialómero, debido a que con microscopio de luz aparece como zona clara, sin estructuras, con excepción de escasos gránulos, sin embargo, con microscopio electrónico (ME), el interior de la plaqueta está compuesto por una masa de elementos fibrosos y un haz de microtubulos bajo la pared celular y cerca de su mayor circunferencia, constituyendo el primero y más prominente sistema fibroso del hialoplasma, hay un segundo sistema formado por microfilamentos. Las funciones de este complejo sistema fibroso intracelular, son llevar a cabo los movimientos centripetos altamente orientados de la plaqueta y la retracción del coágulo (Ver figura 10).

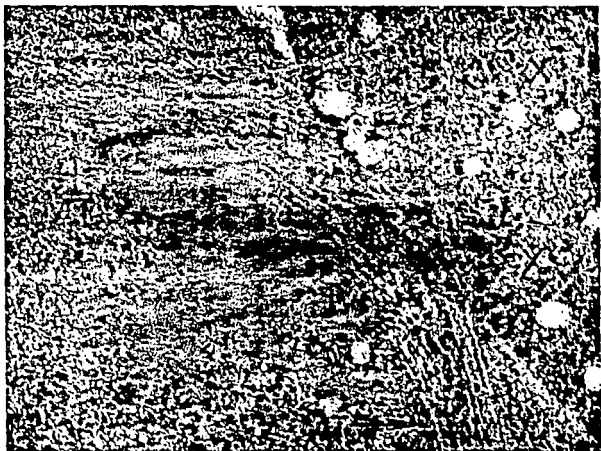


Fig. 123-8. Preparación de la plaqueta sanguínea teñida en negativo y que revela la infraestructura de los microtubulos [MI]. Cada tubulo se compone de 12 a 15 subfilamentos de 50 Å de diámetro. Los subfilamentos están asociados paralelamente, pero quedan intactos en los sitios de rotura tubular (X). Los subfilamentos de los microtubulos son esencialmente idénticos en apariencia a los microfilamentos mostrados en la ilustración anterior [x125.420] [Cortesía de Blond]

**ZONA DE ORGANITOS:** Llama también granulomero, incluye los gránulos alfa, cuerpos densos, mitocondrias, gránulos de glucógeno y en algunas plaquetas aparato de Golgi; solo ocasionalmente se han identificado ribosomas. Todos estos elementos incluidos en el hialoplasma. Los gránulos alfa (también llamados A), parecen ser la fuente de sustancias secretadas por la plaqueta durante la agregación, casi todas constituidas por proteínas: beta tromboglobulina, hidrolasas ácidas, fibrinógeno, y factores que estimulan la mitosis de las células del músculo liso y fibroblastos.

Los gránulos o cuerpos densos se originan de los anteriores; se considera que su transformación esta en relación directa con la captación de serotonina, ADF, ATP, Calcio, Catecolaminas y Factor Plaquetario 4 que tiene actividad neutralizante de la heparina (Ver figura 11).

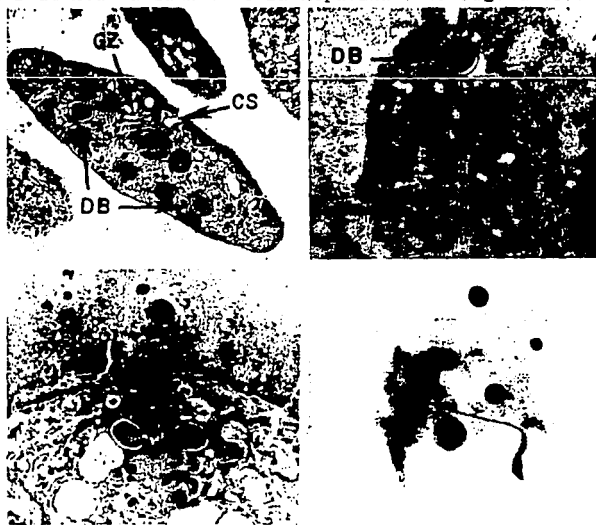


Fig. 123-9. Cuerpos densos plaquetarios. El cuadro a es una delgada sección de una plaqueta de un paciente con albinogenemia; los cuerpos densos son normales (DB). En esta célula también se ven los sáculos aplastados sugestivos de una zona de Golgi (GZ). La célula en el cuadro b ha sido fijada sólo con glutaraldehído. El ácido ósmico no es esencial para la opacidad de los cuerpos densos (DB). El cuadro c es una preparación teñida en negativo que muestra cuerpos densos dentro y fuera de la plaqueta. El cuadro d es una preparación sin teñir que revela la opacidad electrónica de los cuerpos densos y su asociación ocasional con canales fargos y finos. (Cortesía de Blood.)



Las plaquetas son metabólicamente activas, por lo que requieren un aporte constante de ATP, a partir de la glucosa, la cual metaboliza tanto en forma aeróbica como anaeróbica. Contienen todas las enzimas de vía glucolítica, ciclo de ácido cítrico y del monofosfato de la hexosa; contiene suficiente glucógeno, del cual disponen para la vía glucolítica (64,7).

El sistema plaquetario se relaciona cuando menos con 15 proteínas diferentes: fibrinógeno que al parecer es diferente del plasmático, albúmina, prealbúmina, globulinas, plasminógeno, y los factores de la coagulación II, V, VIII, IX, X, XI, XII y XIII. Entre las proteínas específicas de la plaqueta está la trombostenina, proteína contráctil, así como una glucoproteína especial de membrana sensible a la trombina, factores de coagulación de las plaquetas: Factor plaquetario 1 (PF-1), idéntico al factor V; Factor plaquetario 2 (PF-2) que acelera la conversión del fibrinógeno a fibrina, tiene actividad proteolítica, también produce acumulación de plaquetas y neutraliza la antitrombina III. Factor plaquetario 3 (PF-3), lipoproteína, asociada a los gránulos y membrana de la plaqueta: activa al factor VIII y convierte a la protombina en trombina. Cada vez es más seguro que la membrana de la plaqueta sirve como catalítico de superficie local a nivel de la lesión vascular, y quizás representa la actividad de este factor in vivo. El factor plaquetario 4 (PF-4), neutraliza la heparina y la actividad antitrombínica de los productos de desintegración del fibrinógeno; se encuentra en los gránulos de serotonina y en el citoplasma de la plaqueta (8).

La plaqueta posee receptores clásicos de tipo D, que fijan la serotonina de la cual no se conoce su papel si es que existe, en la homeostasis.

### 2.3.- CONSTITUYENTES DE LA MEMBRANA PLAQUETARIA.

Las membranas plaquetarias pueden ser diferentes en su origen de las membranas plasmáticas de las células a partir de las que se forman, ya que lo hacen a partir de vesículas endoplasmáticas muy posiblemente del retículo endoplasmático de los megacariocitos. La membrana consiste en dos capas externas densas al microscopio electrónico de un grosor de 20 Å, y una capa interna menos densa. Normalmente se considera a las dos membranas externas formadas principalmente por proteínas mientras que la interna constaría de una superficie bimolecular preferentemente lipídica. Hay algunas evidencias histoquímicas a favor de la existencia de proteínas y mucopolisacáridos en la superficie de la membrana. La membrana celular plaquetaria tiene una superficie cargada negativamente por acción de la neuraminidasa y que se cree es debida al ácido siálico, N-acetilneuramínico. Hay aproximadamente  $1.9 \times 10^{11}$  moléculas de ácido siálico por  $\mu\text{m}^2$  de superficie plaquetaria o (aproximadamente 11 veces la concentración de los eritrocitos de la sangre humana). La constitución electrocínética de las plaquetas humanas está formada por  $3.5 \times 10^7$  grupos catiónicos de pK 9, probablemente grupos  $\text{NH}_4^+$ , y  $20.5 \times 10^7$  grupos aminogénicos de los que probablemente  $8.9 \times 10^7$  representan iones de neuraminidasa. La mayoría de los grupos aminogénicos restantes tienen un pK de 4 aproximadamente, y están formados probablemente por los grupos carboxílicos de los aminoácidos. Los grupos fosfatos y sulfatos representan menos de 10% de los grupos restantes. El punto isoeléctrico de las plaquetas normales intactas es de 3.88. Dos estimaciones independientes de los receptores específicos para los puntos de anclaje de ADP han proporcionado datos sorprendentemente parecidos con un valor de 0.85 y  $2 \times 10^7$  por plaqueta (57).

Las preparaciones de membranas plaquetarias han demostrado contener proteínas, lípidos neutros, fosfolípidos y colesterol. La relación lípidos/proteínas de las membranas plaquetarias era de 0.58 comparada con la relación total lípidos/proteínas de las plaquetas completas que es de 0.28. Los fosfolípidos representan el 78% de los lípidos de la membrana, el resto por lípidos neutros. La relación colesterol/fosfolípidos es de 0.53.

Las membranas plaquetarias aisladas representan actividad de acetilcolinesterasa. El análisis bioquímico ha revelado que la membrana plaquetaria es una lipoglucoproteína. Los componentes hidrocarbonados se han identificado como glucosa, galactosa, manosa, hexosaminas (GlcN : GalN = 6:1), ácido sialico y fructosa. La composición química fué: proteínas 36%, lípidos 52%; carbohidratos 7.0%; RNA 0.35%; NA 0%; la fosfodiesterasa, fosfatasa ácida y ATPasa de la membrana han sido purificadas 8, 4 y 2 veces más respectivamente (5).

También se encuentran asociadas a la membrana plaquetaria las proteínas de la coagulación anteriormente mencionadas, la lipoproteína (factor plaquetario 3), la ATPasa contractil Mg-Ca-dependiente y la ATPasa inhibida por la guabaina Na-K-dependientes.

## 2.4.- COMPOSICION DE LAS PLAQUETAS.

Las plaquetas estan formadas por la mayor parte de los componentes celulares excepto el DNA (59) (Tabla 1). Las plaquetas forman una poblacion heterogenea de fragmentos citoplasmaticos, cuyo volumen oscila entre 5 y 12  $\mu\text{m}^3$  con un promedio aproximado de 7.5  $\mu\text{m}^3$ . El glucogeno, el nucleotido de adenina, las proteinas, los aminoacidos y ortofosfatos se hallan distribuidos de forma heterogenea entre las plaquetas (39). Esta heterogeneidad de volumen y composicion es probablemente un reflejo de la edad de las plaquetas.

Si se emplea la poblacion plaquetaria total (heterogeneidad) se encuentran 119 mg de proteinas por  $0.78 \times 10^9$  plaquetas/gr de tejido humedo o por ml de plaqueta concentrada ( 29 ). (Con la intencion de alcanzar una uniformidad, todos los datos mencionados expresados en numero de plaquetas o por mg de proteinas se expresan aqui en gramos de peso humedo).

### COMPOSICION DE LA PLAQUETA HUMANA

	% PESO HUMEDO
	g / 100 g
Agua	77
Proteinas	11.90 ; 14.80
Lipidos	2.98 ; 4.98
Carbohidratos	1.98 ; 1.10
Ash	2.21
RNA	0.20
Aminoacidos	0.59 ; 0.53

## AMINOACIDOS.

La poza de aminoácidos libres contenidos en las plaquetas ha sido analizada y comparada al del plasma. Una observación notable es la gran cantidad de taurina que contienen, la cual equivale aproximadamente al contenido total de todos los demás aminoácidos ( $21\mu$  moles/gr). Otros aminoácidos que se encuentran en cantidad apreciable son el ácido glutámico, ácido aspártico, serina y glicina. Estos aminoácidos contrastan con la cistina, histidina y metionina de los que únicamente se encuentran pequeñas cantidades. La comparación entre los valores plasmáticos e intraplaquetario pone de manifiesto un gradiente plaquetas/plasma apreciable para todos los aminoácidos medidos. A este respecto, las plaquetas son similares a los leucocitos. Los mayores gradientes son los que existen para la taurina y el ácido aspártico. Las plaquetas grandes y pesadas contienen 2.1 veces la cantidad de aminoácidos correspondientes a las plaquetas pequeñas y ligeras (29).

## LIPIDOS.

Las plaquetas contienen 2.98 % del peso húmedo y un 14% del peso seco de lípidos. Los fosfolípidos forman el 76% de los lípidos totales; las grasas neutras, el 20%, y las lipoproteínas, el 4% (29).

## SEROTONINA (5 - HIDROXITRIPTAMINA).

El poderoso constrictor de la musculatura lisa, la serotonina (5-hidroxitriptamina) se halla normalmente presente en las plaquetas y no en el plasma. Después de la coagulación o de la agregación plaquetaria, el 20-25% de la serotonina total de las plaquetas es liberada hacia el plasma. Las plaquetas adquieren la serotonina de células secretoras y la concentran por un proceso de transporte activo que requiere energía. La serotonina se halla ligada a unos gránulos pequeños de densidad electrónica elevada, diferente de los gránulos  $\alpha$ . El contenido normal de serotonina de las plaquetas humanas es de 59.3 g/g peso húmedo. Las plaquetas contienen enzimas capaces de metabolizar la serotonina (62) Tabla 2.

## CARBOHIDRATOS.

Los carbohidratos representan 1.9 % del peso húmedo de las plaquetas o el 8.4 % del peso seco. No se encuentra glucosa libre en las plaquetas lavadas ( 37 ). Los carbohidratos plaquetarios están formados por polisacáridos, y heterosacáridos.

## PROTEINAS.

Las proteínas son el constituyente más importante de las plaquetas; representan el 12 % del peso húmedo y el 52 % del peso seco. Por lo menos el 15 % de las proteínas plaquetarias totales están formadas por una proteína contractil por la ATPasa, la trombostenina, que es similar en muchos aspectos a la actinmiosina muscular. La proteína contractil parece estar formada por múltiples subunidades polipeptídicas de posible naturaleza polimérica (85).

El 13.5 % de estas proteínas lo forma el fibrinógeno plaquetario, 25 % del cual se encuentra en las fracciones granulares, mientras que el resto es extracelular.

La albumina plaquetaria forma el 2 % de las proteínas totales, y a pesar de no encontrarse asociada a la fracción de las membranas o de los gránulos es intracelular.

Las enzimas lisosómicas que se encuentran probablemente en las plaquetas se exponen en la tabla 2. La enzima sérica fosfatasa ácida ( $\beta$  - glicerofosfato) es un derivado enteramente de las plaquetas. Se desprende durante su degranulación irreversible. Una proporción de fosfatasa ácida (p - nitrofenil fosfato) (39 - 76 %) provienen de las plaquetas (55).

Como se mencionó con anterioridad en la plaqueta se encuentran las enzimas de varias vías metabólicas, a continuación se mencionan las más representativas (38):

#### VIA DE EMBDEN-MEYERHOF Y ENZIMAS RELACIONADAS (VIA GLUCOLITICA)

Glucógeno fosforilasa  
Hexocinasa\*  
Fosfoglucomutasa\*  
Fosfhexoisomerasa\*  
Aldolasa\*  
Triosa fosfato isomerasa  
 $\beta$ - glicerofosfato deshidrogenasa\*  
Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa\*  
3-Fosfoglicerocinasa  
Fosfogliceromutasa\*  
Enolase  
Piruvato cinasa  
Láctico deshidrogenasa\*

#### CORTO CIRCUITO DE LA HEXOSA MONOFOSFATO Y ENZIMAS RELACIONAS VIA DE LAS PENTOSAS)

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa  
6-fosfogluconato deshidrogenasa  
Transcetolasa  
Glutation reductasa

#### CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS Y ENZIMAS RELACIONADAS

Deshidrogenasa asicátrica  
Deshidrogenasa succínica  
Deshidrogenasa málica  
Citocromo oxidasa  
Transaminasa glutámico-oxalacética  
Transaminasa glutámico-piruvica  
Glutámico deshidrogenasa

#### ENZIMAS DE LA GLUCONEOGENESIS

Glucógeno sintetasa\*  
Fructuosa 1,6-difosfatasa\*  
Glucosa 6-fosfatasa  
Piruvato carboxilasa\*\*  
Fosfoenolpiruvato carboxicinas\*\*



#### ENZIMAS LISOSOMICAS.

Fosfatasa ácida, alcalina y neutra  
Leucina aminopeptidasa  
Catapsina  
Peptidasas de varias especificidades  
 $\beta$ - glucosidasa

#### ENZIMAS DE METABOLISMO LIPIDICO

Acetil coenzima A carboxilasa  
Sintetasa de ácidos grasos  
CTP:diacilglicerofosfato-citidil transferasa  
CDP-diglicerido:mionositolfosfatidil transferasa  
Fosfatasa del ácido fosfatídico  
Lecitinasa

#### ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LOS NUCLEOTIDOS Y NUCLEOSIDOS

Adenilatocinasa  
Adenosincinasa\*\*  
Fosforribosil transferasa  
Fosforribomutasa\*\*  
Adenosindeaminasa  
Nucleosido fosforilasa  
Deaminasa del ácido adenílico  
Adenosintrifosfatasa

Trombostenina  
Na-K ATPasa de la membrana adenilatociclasa

#### ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LA SEROTONINA

Monoamino-oxidasa  
Alcohol deshidrogenasa  
Aldehído deshidrogenasa

## OTRAS ENZIMAS

Amilasa  
Aril sulfatasa  
Anhidrasa carbónica  
Catalasa  
Diacetilcolinesterasa

---

†Se encuentran presentes en las plaquetas jóvenes en cantidad doble aproximadamente que en las plaquetas viejas.

\*\*Se infiere su presencia.

El aspecto que más a llamado el interés de acuerdo a investigaciones recientes, es la importancia de las enzimas de la vía metabólica de la serotonina ya que la enzima principal es la monoamino-oxidasa, que en la actualidad, como hemos venido mencionando se sugiere como un marcador bilógico (22,41,50,63).

FALLA DE ORIGEN

## 2.5.- FUNCIONES DE LAS PLAQUETAS

La principal función de las plaquetas es su papel mecánico y químico, en la hemostasia y en la reconstrucción de los vasos: reparan lesiones del endotelio vascular, facilitan la retracción del coágulo, suministran un mecanismo de la coagulación. Junto con el ADF pueden activar al factor XII, e incluso, sin necesidad de activar a éste, pueden activar al XI, en unión con la colágena. Transportan enzimas, también productos químicos en el organismo, demostrado por su contenido de serotonina (11).

Está demostrado su función fagocítica y se ha sugerido que también pueden desempeñar algún papel en el rechazo de órganos transplantados.

La actividad de una enzima en una plaqueta circulante está probablemente determinada por factores específicamente genéticos, que regulan la formación de la enzima durante el estado de megacariocito (precursor de las plaquetas), también factores exógenos que regulan la velocidad de producción de plaquetas, el grado de desarrollo, la liberación y la edad de las mismas. Las plaquetas más grandes son las más pesadas y probablemente las más jóvenes; las pequeñas son las más ligeras y seguramente las más viejas (76,77).

El recuento de plaquetas es cuantitativo e informa acerca del número de plaquetas circulantes. El factor utilizado para calcular el resultado, es de 2,500 a 5,000; y el que se emplea para recuento directo es de 1,000 a 1,500. Una diferencia de 10 plaquetas en el recuento con cualquiera de los dos métodos puede dar una diferencia de 10,000 a 50,000 plaquetas por milímetro cúbico. El examen cuidadoso de un frotis de sangre periférica, muchas veces brinda tanta información como el recuento cuantitativo de las plaquetas. En la actualidad se utilizan contadores electrónicos automatizados que dan mayor precisión y rapidez (11).

La observación de que las plaquetas contienen receptores  $\beta$  - adrenérgicos, concentran activamente, metabolizan y/o secretan aminas biógenas en respuesta a agonistas específicos, ha llamado la atención de los investigadores en el campo de la neuropsiquiatría (61). Ys que se han encontrado algunas similitudes con las neuronas del sistema nervioso central. Una de ellas y muy importante para nuestro trabajo es la presencia de la monoamino-oxidasa (MAO), que es la principal enzima degradativa y la más estudiada de las catecolaminas, indolaminas y otras aminas biógenas. La MAO tiene un papel muy importante en la regulación de las neuronas endógenas que almacenan neurotransmisores monoamínicos.

### 3. ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA MONOAMINO OXIDASA

La monoamino oxidasa mitocondrial es una enzima catabólica que inactiva mediante desaminación oxidativa una extensa variedad de aminas formadas en el cuerpo, algunas de las cuales tienen importantes funciones como neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas. Por otro lado, el descubrimiento de los inhibidores de la monoamino oxidasa hecho por Zeller y col. en 1952 (84) y el reconocimiento general de su significado en la medicina clínica ya que son un grupo de fármacos designados a bloquear el sitio activo de la enzima produciendo un efecto antidepressivo (4), esto incrementa considerablemente el interés por conocer la naturaleza y propiedades de la enzima (6).

La monoamino-oxidasa mitocondrial también nombrada como:

Monoamina O<sub>2</sub> oxidoreductasa desaminante)

Tiramina oxidasa (32)

Amino oxidasa (10)

Monoamino oxidasa (86)

Esta cataliza la desaminación oxidativa de tiramina, triptamina, serotonina, dopamina, norepinefrina, epinefrina y otras monoaminas.

En la reacción que cataliza la MAO mitocondrial determinada por Hare en 1928 (32), se lleva a cabo una desaminación oxidativa, proceso catalizado por una oxidasa dependiente de flavina.



El principal producto es la formación de un aldehído a partir de una amina, de oxígeno y agua.

El amoníaco liberado podría usarse nuevamente en otras reacciones, tales como amidación de glutamato y aspartato o glutamina y asparragina, la mayoría es escrotada como amoníaco o urea (47).

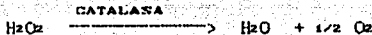
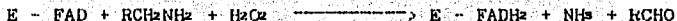
Kerry (43) reportó que la reacción se divide en una fase anaeróbica y una fase aeróbica.

En donde la flavoproteína reducida reacciona directamente e irreversiblemente con oxígeno produciendo peróxido de hidrógeno, sustancia de potente toxicidad. Sin embargo, existe una válvula de seguridad con la forma de una enzima especial denominada catalasa que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

La reacción aeróbica se describe en la ecuación siguiente:



La reacción aeróbica es la siguiente:



### 3.1.- DISTRIBUCION EN TEJIDOS

La MAO es una enzima encontrada en la cara externa de las mitocondrias, y aunque se ha reportado que una cantidad relativamente pequeña de actividad de MAO está asociada con la fracción microsomal de la célula; esta puede ser derivada de las mitocondrias como el resultado del daño que ocurre durante el procedimiento de fraccionamiento celular (36).

La MAO está ubicada en todos los tejidos de los vertebrados. Las fuentes ricas en la enzima incluyen el hígado, riñón, intestino, estómago, borta, la paratiroides y la glándula submaxilar, mientras que en el músculo esquelético, el plasma sanguíneo y los eritrocitos se presenta en pequeñas fracciones. Su presencia en plaquetas fue demostrada por Collins y Sandler (13) en las preparaciones celulares la máxima actividad se encontrará en los sinaptosomas ya que son ricos en mitocondrias, aunque también está presente en la glia y en los vasos sanguíneos.

### 3.2.- PROPIEDADES DE LA MAO MITOCONDRIAL

A partir de los procedimientos de purificación y solubilización de la enzima se han obtenido dos componentes (componente 1 y 2). El componente 2 tiene una alta actividad enzimática. Ambos componentes de color amarillo brillante con unas absorciones máximas a 274, 410, y 450 nm., los coeficientes de sedimentación son de 14.4 y 20.6 S y los pesos moleculares son de alrededor de 405 y 1 280 respectivamente. El componente 1 contiene 4 FAD (Flavin Adenin dinucleótido) mientras que el componente 2 contiene 12 FAD por mol de enzima. La primera indicación de que el grupo prostético de la enzima es una flavina fue en 1966 (58) y se encontró que el FAD parece estar estrechamente unido mediante un enlace covalente (58). Los componentes 1 y 2 contienen 24 y 106 moles de fosfolípidos por molécula de enzima, respectivamente y se ha sugerido que el

componente 2 puede ser el producto del arreglo del componente 1 por lo que parte de la multiplicidad de la enzima es debida a su aislamiento en forma de diferentes pesos moleculares. Los componentes 1 y 2 contienen respectivamente 28 y 86 grupos sulfhidrilos por mol de enzima o 7 grupos sulfhidrilo por 100,000  $\mu$ gs. de proteínas y se ha sugerido que dichos grupos son necesarios para la estabilidad conformacional requerida por la enzima durante la catalisis.

Se ha pensado en la posible participación de un ión metálico en la actividad de la enzima y se ha observado que el cobre no es un grupo prostético esencial (56).

En 1955 Satake (68) sugirió que la MAO puede ser una mezcla de enzimas que tienen especificidad para diferentes sustratos y que en los tejidos pueden existir varias formas. En estudios sobre el efecto de la actividad de la enzima, se observó que esta varía de acuerdo al sustrato empleado y se ha inferido la existencia de varios subtipos (54,18). Existen por lo menos dos tipos de MAO que despliegan preferencia por distintos sustratos y poseen distinta sensibilidad frente a los inhibidores selectivos. La MAO-A se encuentra en las terminales sinápticas, en la mucosa intestinal y en los fibroblastos; desamina selectivamente a la serotonina y a la norepinefrina y es muy sensible a la inhibición por clorgilina. La MAO-B esta situada en las plaquetas oxida tiramina pero no a serotonina, prefiere como sustrato a la feniletilamina y es muy sensible a la inhibición por bajas concentraciones de deprenil y pargilina. Recientemente se han presentado evidencias de que estos dos subtipos son diferentes proteínas. La MAO-B se encuentra localizada en la glía y en las áreas ricas en serotonina. Este último está en aparente contradicción con el hecho de que la MAO-A la que prefiere a la serotonina como sustrato. Por otra parte hay grandes diferencias de proporción de los subtipos entre especies, de tal forma que en los cerebros de primates y humanos predomina la MAO-B y en los roedores la MAO-A. La gran proporción de MAO-A en el intestino humano puede servir como barrera contra aminas potencialmente tóxicas provenientes de la dieta o de las bacterias intestinales. Las características de estabilidad térmica y pH óptimo de preparaciones de MAO mitocondrial varían de acuerdo al sustrato empleado (74).



### 3.3. ISOFORMAS DE MAO

Antes de los 60's se consideraba que la MAO era una enzima única. Y posteriormente se establece la posibilidad de algunas formas de la enzima, numerosos estudios posteriores establecen que esto es cierto. Por ejemplo, Oswald y Strittmatter (1963) observaron que hay una diferencia en la estabilidad térmica y en la actividad enzimática de serotonina y tiramina en mitocondria de hígado de rata.

Youdim y Sandler en 1967 separaron cinco bandas de MAO activa por medio de electroforesis con geles de poliacrilamida. Estas fueron las primeras evidencias de las múltiples formas de MAO aun que no es indispensable la separación de las especies usando los procedimientos de solubilización y aislamiento de la enzima. Existen evidencias de que las bandas de actividad de las diferentes formas de MAO demuestran diferencias en sensibilidad e inhibición de sustrato.

Una de las evidencias más convincentes de las múltiples formas de MAO es basado en las observaciones de Johnston (1968), quien establece que existen dos formas de MAO las cuales son distinguidas por la sensibilidad por clorgilina. Basándose en un ensayo sometiendo a varias concentraciones de este inhibidor en muestras de hígado y cerebro de rata homogéneos, donde se determinó la actividad de MAO con tiramina como sustrato, resultando unas curvas de inhibición bifásicas. La actividad enzimática, con clorgilina fue inhibida por una concentración muy pequeña del inhibidor, fue designado de tipo A. Los restos activos fueron inhibidos sólo por concentraciones muy elevadas y se le llamo de tipo B (71).

Algunos sustratos establecen una relativa especificidad de alguna de las formas ya sea A o B de MAO. Con la inhibición por clorgilina como sustrato se obtiene una curva única sigmoide, indicando que el sustrato es desaminado por sólo tipo de MAO activo. Esta curva sigmoide aparece

con muy bajas concentraciones de clorgilina, por lo que el sustrato es específico para la forma A. Por lo que la curva aparece sólo en concentraciones altas para la forma B (30,33).

En la tabla 1 se muestran la especificidades de cada uno de los tipos de MAO en varias aminas.

SUSTRATO ESPECIFICO DE A	SUSTRATO ESPECIFICO DE B	SUSTRATOS NO ESPECIFICO
Serotonina	Bencialmina	p-tiramina
Norepinefrina	Feniletilamina	m-tiramina
Normetanefrina	Feniletanolamina	Triptamina
	Metilhistamina	Dopamina
	o-tiramina	Octopamina
		Norepinefrina

La tabla 2 indica algunas de las propiedades químicas y fisiológicas que estudian la diferencia entre las enzimas A y B. En virtud de esas propiedades, con la probable excepción de movilidad electroforética, se han demostrado las diferencias entre A y B.

#### Propiedades químicas

Especificidad de sustrato  
Sensibilidad del inhibidor  
Termoestabilidad  
pH óptimo  
Movilidad electroforética  
Reacción inmunológica  
Tratamiento con enzimas proteolíticas,  
lipasa, o agentes castrópicos

#### Propiedades Fisiológicas

Diferencia de especies  
Diferencia de órganos  
Localización celular: localización subcelular;  
cultivo celular;

La demostración de las múltiples formas de MAO se hizo por inactivación térmica diferencial, esto no ha sido muy aceptado porque la diferencia en estabildades térmicas hacia diferentes sustratos es cada vez menor o desaparece aislando mitocondrias en vez de todos los tejidos homogéneos (Houslay and Tripton 1976). Sin embargo, este efecto puede explicarse por el uso de amortiguadores en el aislamiento resuspendiendo mitocondrias, desde entonces las estabildades térmicas de ambas actividades de A y B en mitocondrias son idénticas a las actividades de todo el homogenizado, proveniente de la resuspensión de las mitocondrias (Edwards, Pak, and Venetti 1979). El tipo de MAO-A aparece en corazón y es inhibida por clorgilina con el uso de fenietilamina y bencilamina como sustratos para MAO en corazón de rata (Lyles and Callingham 1975). La deaminación de fenietilamina por MAO es inhibida por clorgilina pero no por defrenil. Nuevamente la afinidad por esta enzima es poca ( $K_m$  es  $114 \mu M$ ), es comparada con la alta afinidad presente en la forma B de la enzima ( $3-5 \mu M$ ) (Edwards, Pak, and Venetti 1979).

Esto es debido a que el factor de las formas A y B de la enzima que no es absolutamente específico por así llamarlo sustrato "específico": por lo tanto, donde una forma de la enzima es predominantemente grande, como en el caso de corazón de rata, no puede ser nunca deaminado algún sustrato normalmente selectivo por la otra forma.

Otro ejemplo de sustrato específico de una forma de MAO actuando como un sustrato por la otra forma es la deaminación de serotonina por MAO plaquetaria en humano aunque las plaquetas humanas sólo contienen la forma B de la enzima (basados en los criterios de inhibidores selectivos). La serotonina ha servido como sustrato en humanos para MAO plaquetaria (Edwards and Chang 1975). Sin embargo, estudios cinéticos muestran que aparentemente el  $K_m$  de el sustrato es mayor diez veces que las características que la forma A de la enzima (71).

Además toda la actividad de la MAO plaquetaria en humano se ha medido con serotonina como sustrato el cual es sensible a la inhibición por bajas concentraciones de defrenil pero no con clorgilina. En contraste, en plaquetas de conejo, quien contiene preferentemente la forma A de MAO; i.e., con un Km bajo de alta sensibilidad de inhibición por clorgilina y no por defrenil (Edwards and Chang 1975). Estos resultados nos llevan a la conclusión que la MAO en plaquetas humanas es similar en propiedades cinéticas de tipo B en otros tejidos, usando como sustrato a serotonina.

Ya sea que las formas A y B de la enzima representan más que una proteína esto no retracta el factor de que pueden realmente demostrarse in vitro e in vivo. Así, la importancia farmacológica es incuestionable. Sin embargo, un mejor entendimiento de esas bases moleculares pueden guiarnos a la respuesta de cada cuestión como control genético de MAO plaquetaria en la forma A y B.

Otra cuestión es definir a las formas A y B de la enzima. Algunos investigadores prefieren definir a estas en términos de actividades y selección al sustrato. El problema con definir los tipos A y B activos basados en serotonina y fenietilamina deaminados activamente es la falta de especificidad absoluta de esa especie de enzimas. Otros investigadores prefieren mantener la nomenclatura de Johnston (1968) para usar tiramina como un sustrato no selectivo y el inhibidor selectivo es obtenido de las curvas de inhibición. Donde la proporción de de las enzimas de A y B es definida por la localización de la meseta. Sin embatgo, una dificultad con este acercamiento es que una de las formas esta presente en muchas pequeñas cantidades que la otra, la curva no puede aparecer bifasica, y puede ser imposible distinguirse la meseta de la línea basal. Así nosotros creemos que lo mejor es usar inhibidores selectivos en combinación con el sustrato selectivo que mide la actividad de las enzimas A y B (Edwards and Malsbury 1978).

### 3.4.- PAPEL FISIOLÓGICO DE LA MAO MITOCONDRIAL

La Monoamino-oxidasa y la catecol-o-metil-transferasa (COMT) son consideradas como las enzimas más importantes que participan en la degradación metabólica de las catecolaminas y la serotonina (10).

Crowl (16) sugiere que COMT es la enzima más importante para la activación de catecolaminas en el hígado mientras que MAO es más importante en cerebro y corazón.

Gorkin y Orekhovitch (28) reportan una interesante observación sobre el efecto del producto de desaminación oxidativa de tiramina catalizada por MAO mitocondrial de hígado de rata sobre la oxidación de succinato, en fragmentos mitocondriales que sugieren una posible participación de MAO en la regulación de la respiración tisular, además se sugiere que los aldehídos producidos por la acción de MAO pueden estar involucrados en el mecanismo del sueño (13). La MAO de la tiroides parece ser inactiva hacia adrenalina y noradrenalina pero activa para tiramina; esto ha sugerido que metabolitos producidos por MAO pueden funcionar como un sistema generador de peróxido de hidrógeno para la síntesis de lodotironina (36). Por otro lado, respecto al efecto del crecimiento, maduración y producción de hormonas sobre los niveles de MAO se ha observado que para predecir el resultado del experimento in vivo no es suficiente considerar la existencia de sus formas de MAO sin también tomar en cuenta que en un órgano o una especie dada los niveles de MAO no son siempre constantes. En algunas especies, por ejemplo en el ratón, rata y hombre pero no en el cobayo, la actividad de MAO está por abajo de los valores encontrados en los adultos individuales. Los niveles de enzima normales y anormales en el ratón adulto se alcanzan aproximadamente dos semanas después del nacimiento. Sin embargo, en el corazón de rata la actividad de MAO va incrementándose a través de su vida. De tal forma que los niveles de MAO también son determinados por la tiroides y las hormonas sexuales.

Sin duda el aspecto clínico más estudiado en las plaquetas es la actividad de MAO (12), la cual es también la enzima relacionada con el metabolismo aminérgico que más se ha estudiado (61).

Paralelamente al interés creciente en la plaqueta como modelo de investigación, el conocimiento primario acerca de su biología se ha expandido rápidamente y sabemos que muchas de sus propiedades específicas pueden influenciar la interpretación de los datos provenientes de ella (15,76,77).

La separación de las plaquetas es un procedimiento relativamente sencillo y son además de fácil acceso por extracción sanguínea. Por lo que se utilizan para este estudio y no las neuronas ya que es muy difícil obtenerlas. En las plaquetas se han estudiado ampliamente el transporte de serotonina (5-HT), y ha sido motivo de experimentos en relación con los sitios de unión a imipramina marcada (84).

Es por esto que se ha hecho una revisión exhaustiva de cada uno de los métodos empleados para separación de plaquetas.

A continuación se enumerarán los métodos que a nuestro criterio y corroborando con otros autores son los mejores para la cuantificación de estas, tomando en cuenta material, tiempo, costos y sobre todo mayor rendimiento, ya que es de gran importancia para la determinación de la actividad de MAO.

#### 4.- REVISION DE METODOS DE SEPARACION DE PLAQUETAS

Se han descrito y reportado varios métodos de separación y lavado de plaquetas. Estos están basados en la preparación de suspensión de plaquetas por centrifugación mediante gradientes de albumina, temperatura baja, soluciones de pH bajos, la exclusión de  $Ca^{2+}$  y de  $Mg^{2+}$ , adición de EDTA, EGTA, citrato, aspirasa y prostaciclina. PGI<sub>2</sub> este último se ha usado para prevenir la actividad de plaquetas.

Los problemas encontrados en estos métodos incluyen la producción de plaquetas con baja sensibilidad de ADP, agregación espontánea después del lavado, baja recuperación de plaquetas a partir de la sangre, cambios en la capacidad de la plaqueta a sufrir la reacción de liberación y decremento en la habilidad para mostrar cambios en la forma después de la adición de agentes proagregantes.

En resumen, existen en la literatura dos métodos para la obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) los cuales son: el de centrifugación diferencial (convencional); el de Corash que emplea gradientes de densidad, y en el que se utiliza una solución buffer de lavado.

El aislamiento de plaquetas de edad específica requiere de una recuperación cuantitativa y eficiente de una población de plaquetas presente en la sangre que conserve su función celular y su estructura.

Las variaciones en la población de plaquetas jóvenes (pesadas) y viejas (ligeras) aisladas por diferentes técnicas de centrifugación puede ser una fuente de error para fines comparativos de la actividad de MAO entre sujetos aunque la actividad es una función de edad y densidad de las plaquetas.

En el método de Corash se aplica la centrifugación isopícnica y utiliza una solución isosmótica de Stractan que contiene un polisacárido de arabinosa-galactasa, este método fue desarrollado para aislar y fraccionar poblaciones de plaquetas humanas en subpoblaciones dependientes de la densidad.



## 5. - TECNICAS DE SEPARACION DE PLAQUETAS

### 5.1. - CORASH LAURENCE, M.D (15).

Es un nuevo método para la preparación del coágulo de plaquetas, que evita muchos problemas y otorga un 98% de la recuperación de la población de plaquetas y sin tener contaminación de proteínas del plasma y leucocitos.

#### METODO.

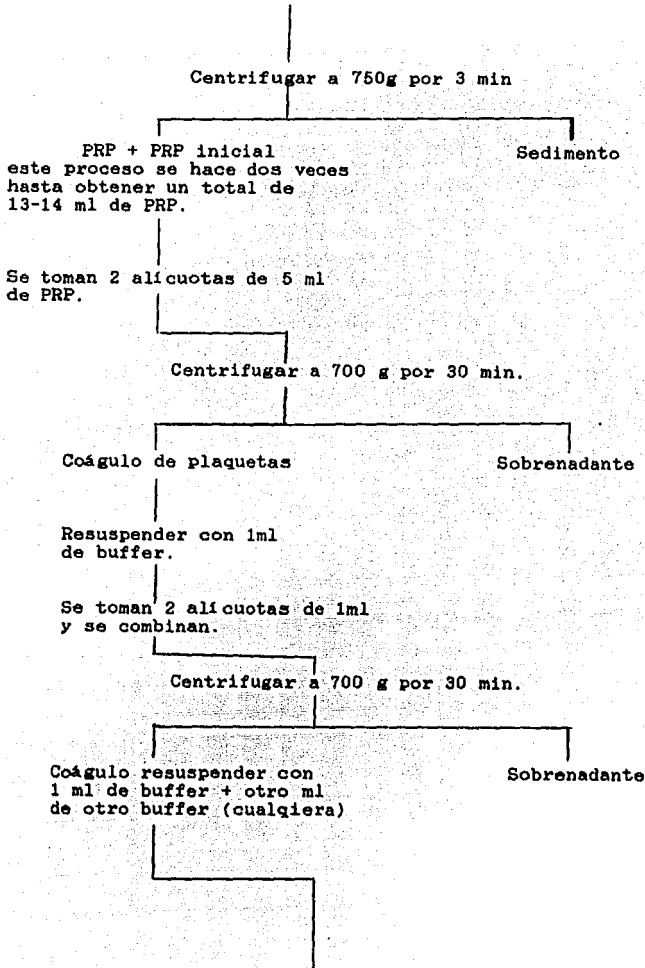
A 4.5 ml de sangre se adiciona  
5 ml de citrato (0.132M)  
EDTA (disódico 0.1M)  
mezclar lentamente  
+  
2 ml de buffer isotónico  
(1.45M clorhidrato disódico  
0.1N fosfato monosódico y  
3.14 mM, EDTA disódico pH 6.5)  
mezclar

centrifugar a 750 g por 3 min.

Sobrenadante  
contiene PRP  
aislar y lavar  
con 3.2 ml de buffer

Sedimento  
células rojas

+  
adicionar el coágulo de células rojas  
mezclar y resuspender.



Centrifugar a 1500 g por 20 min.

Coágulo final  
de plaquetas y almacenado  
a 50°C.

Sobrenadante

5.2.-CORASH, L. TAN, AND GRALNICK. (14).

METODO.

A 50 ml de sangre  
se adiciona anticoagulante  
de citrato de sodio dihidratado  
al 4 % (pH 7.76) en relación  
1:9 volumen de sangre total

Se toma una alícuota de 10 ml  
de sangre con citrato al 4%

Centrifugar a 600 g por 3 min.  
a 20 °C

PRP inicial

paquete rojo  
+ solución Stactan  
(arabino-galactano)  
al 10% a su volumen  
original.

A esta solución se le añade otra solución de Starctan  
al 20 % de igual volumen que el anterior

Centrifugar a 2500 g por 10 min.  
a 20 °C

Sobrenadante  
plasma-plaquetas

Sedimento de plaquetas  
en la interfase 1.084g/ml  
(plaqueta-Starctan)



5.3.- ARNOLD J. FRIEDHOFF, JEANNETTE C. MILLER, AND SIMON KARPATKIN (23).

Los niveles de actividad de MAO han sido usados como referencia genética para ciertas distorciones mentales. El proposito de este estudio es investigar la influencia de varios factores no genéticos en plaquetas.

**METODO.**

Se toman 25 ml de sangre  
y adicionan 3 ml de EDTA al 5%  
mezclar cuidadosamente.

Se toman 4 porciones de 5 ml

Centrifugar a 100 g por 20 min. a 4°C

PRF

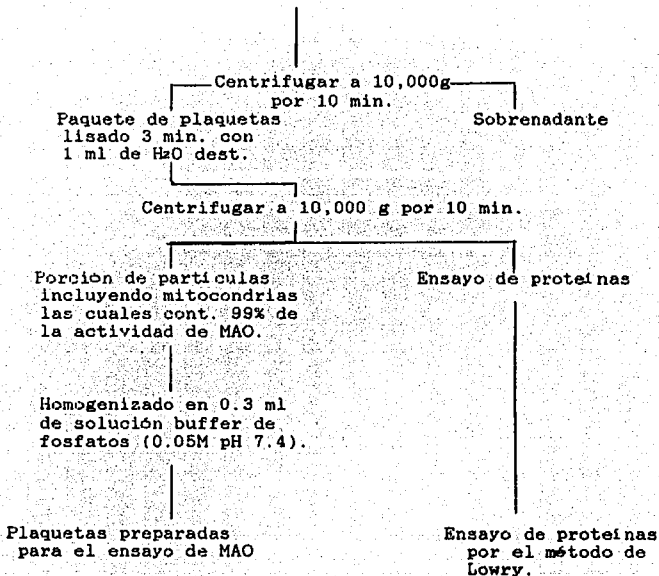
Celulas rojas

Centrifugar a 2500 g por 30 min.

El plasma se reunió con 20 ml  
de la sangre inicial.

Faquete de plaquetas

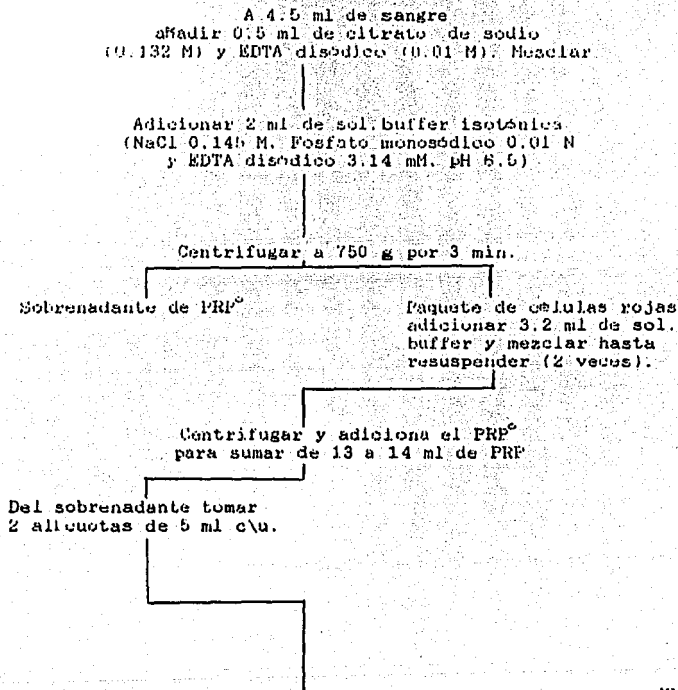
Resuspender en 5 ml  
de solución salina  
isotónica.



5.4. WISE, DAVID., POTKINS, STEVEN, BRIDGE, P. (79).

Un nuevo método para la preparación de plaquetas que no emplea centrifugación diferencial, en donde se obtiene un 96% de recuperación de la población de plaquetas sin contaminación de proteínas plasmáticas, células rojas y leucocitos.

METODO.

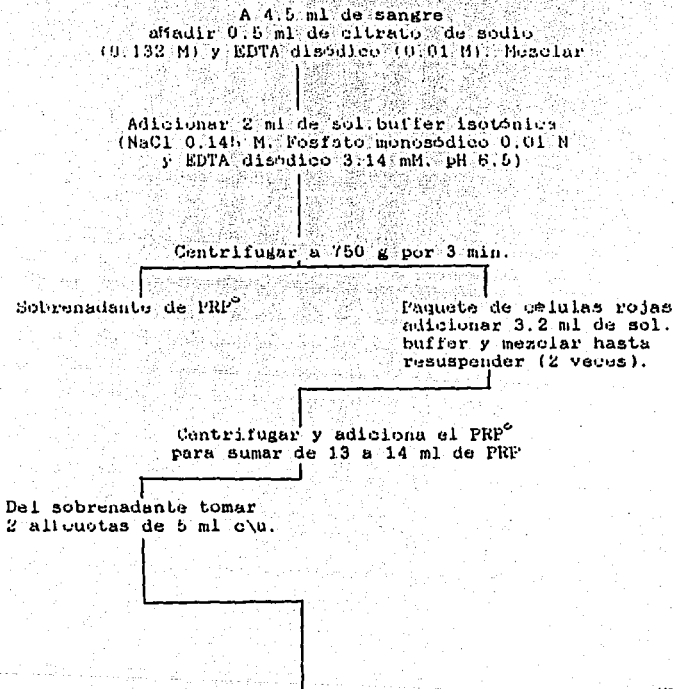


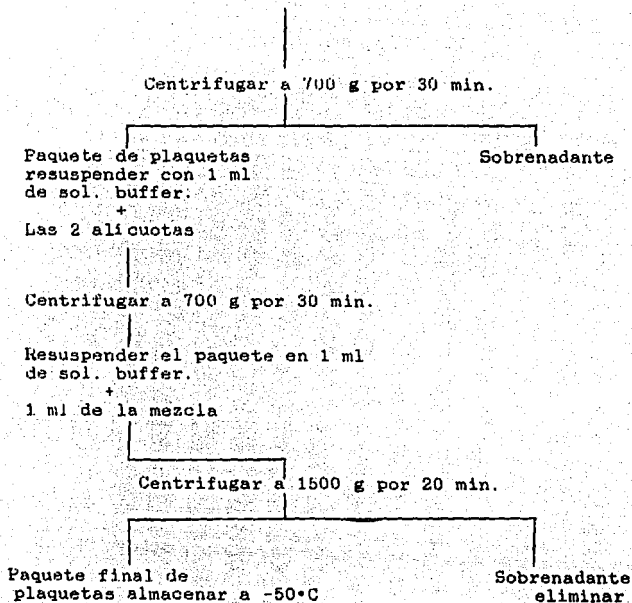


5.4. WISE, DAVID., POTKINS, STEVEN, BRIDGE, P. (79).

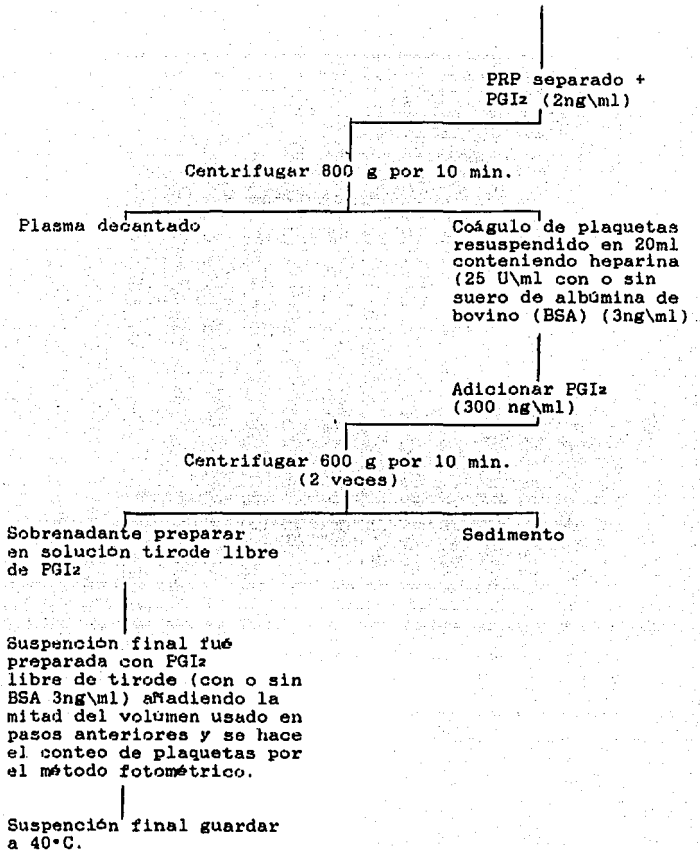
Un nuevo método para la preparación de plaquetas que no emplea centrifugación diferencial, en donde se obtiene un 98% de recuperación de la población de plaquetas sin contaminación de proteínas plasmáticas, células rojas y leucocitos.

**METODO.**





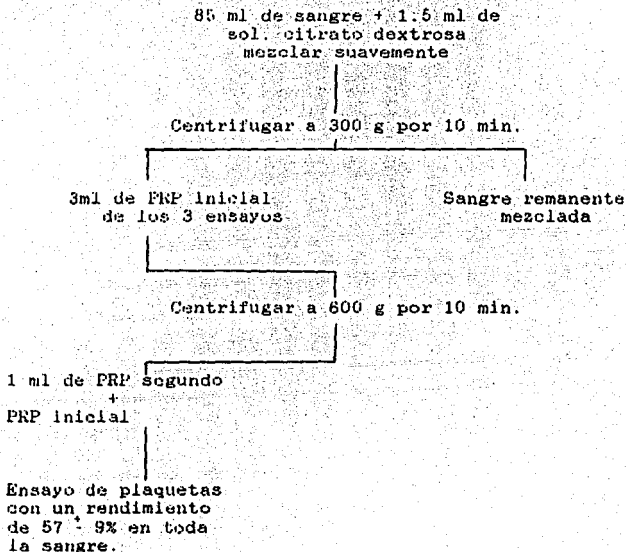




5.6.- HERBERT JACKMAN, RAMESH ARORA AND HERBERT Y. MELTZER  
(35).

Este método se basa en una comparación del rendimiento en una separación de plaquetas y proteínas en plaquetas para un ensayo de actividad de MAO posteriormente.

**METODO.**



FALLA DE ORIGEN <sup>53</sup>

**NOTA.**

La concentración de plaquetas en el PRP general es de un rango  $1.6 \times 10^9$  plq/ml a  $2.8 \times 10^9$ . En conclusión el 90 % del total de plaquetas fue obtenido en la 1.<sup>a</sup> centrifugación.

Aquí surgirá una duda de porque entonces todo lo anterior, y es muy razonable, pero para llegar a dicha conclusión tuvo que llevarse acabo todo el procedimiento.

5.7. RAMESH C. ARORA, SUMAN SAHAI Y HERBERT Y. MELTZER.  
(65).

La actividad de Monoamino-oxidasa (MAO) en plaquetas sanguíneas de humano aisladas por centrifugación simple a 600 g por 2.5 minutos, tuvo un total de 45-65% de plaquetas, el cual ayuda a tener actividad de MAO plaquetaria mayor.

METODO.

A una muestra de 4.5 ml. de sangre  
se le adiciona 0.75 ml. de (ACD) Acido citrato  
dextrosa y mezclar

Centrifugar a 600 g por 2 1/2 min.  
a una temp. de 0-4°C

Separar el PRP

Conteo de plaquetas  
por em método de Corash  
a 4.95 ml + 0.05 ml de  
EDTA al 10% diluido con  
buffer.

Centrifugar a 600 g por 3 min.  
(5 veces)

o sobrenadantes  
para ensayo de MAO.

Plaquetas

5.8.- RICHARD R. FRITZ, CRRED W. ABELL, RICHARD M. DENNEY,  
COSNTANCE B. DENNEY, J. DAVID BESSMAN, J. ALEXANDER  
BOERINGA, AND ROBERT M. ROSE (24).

Este es un método para la determinación de centrifugación específica y actividad molecular de monoamino-oxidasa (MAO) en plaquetas como fue descrito y evaluado en paralelo con la actividad específica medida, preformada en toda la plaqueta y extractos de plaquetas. La concentración específica de MAO plaquetaria es determinada en extractos de plaqueta por un radioinmuncensayo, usando anticuerpo monoclonal que reconoce a la MAO-B humana, la cual es la forma que presentan las plaquetas. El rendimiento es de 90%.

#### METODO.

45 ml de sangre colectada en un tubo de centrifuga de 50ml donde contiene 0.45 ml de EDTA al 10 % con pH 7.2 mezclar.

Se adicionan a los 45 ml, 18 ml. de solución buffer de fosfatos, pH 7.2

Centrifugar a 600 g por 3 min.  
a 25 °C

El PRP se guarda

Células rojas y  
capa intermedia

Adicionar 18 ml  
de sol. lavadora

Centrifugar a 600 g por 3 min.  
(repetir 4 veces)



b.9. K. LLENARES. (49)

En términos generales el método empleado consiste en el aislamiento y la purificación de plaquetas a partir de muestras de sangre donada por voluntarios, la que debe conservar sus actividades metabólicas en buen estado.

Este aislamiento y purificación de plaquetas se siguió con pequeñas modificaciones, de acuerdo a la técnica descrita por Vargas et al. (1982). La parte medular de este novedoso procedimiento es el empleo de un miembro de las prostaglandinas, la prostaciclina 1 (PGI<sub>1</sub>), que es un inhibidor biológico específico del fenómeno de activación de la plaqueta (i.e. agregación y disminución de una serie de valores metabólicos de esta estructura hemática).

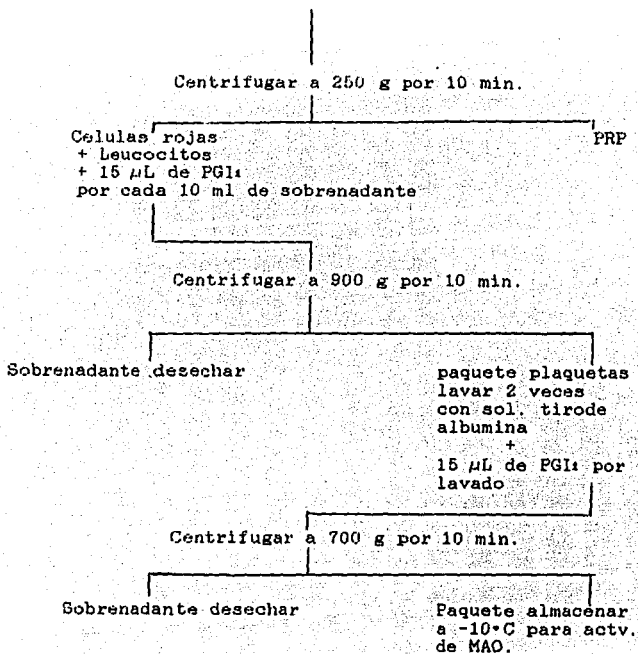
Con la técnica que aquí se emplea se puede afirmar que se asiste a la etapa de las plaquetas sin problema de aislamiento con excelentes valores de actividad biológica aproximadamente nos da un rendimiento de 80% del total de plaquetas.

**METODO.**

A 40 ml de sangre venosa agregar 2.8 ml  
de citrato trisódico al 4% y 0.2 ml  
de heparina (5,000 U/ml) mezclar

Centrifugar a 350 g por 15 min.

El Pkt<sup>s</sup> se separa + sedimento  
3.0 µL de PGI<sub>1</sub>  
por cada 10 ml de PRP.



## 6.- METODOS DE MONOAMONO-OXIDASA

De acuerdo a los estudios realizados se ha encontrado y determinado los factores que afectan la determinación de monoamino-oxidasa (MAO).

Existe alguna variación entre los diferentes procedimientos de cada uno de los ensayos, sobre todo el efecto de conteo de plaquetas comparado con la determinación de proteínas. Este último podemos decir que no es muy seguro ni confiable ya que el conteo de plaquetas es significativamente más seguro y con mayor rendimiento para el ensayo de actividad de MAO (53,35).

Los efectos de las condiciones de centrifugación sobre la actividad de MAO en las plaquetas son: a un menor gradiente y tienen un porcentaje mayor que a uno más alto (65).

La posible importancia de la actividad de monoamino-oxidasa en plaquetas como un marcador para la vulnerabilidad en alguna alteración o psicopatología en general (1,52).

Las diferencias en los criterios del diagnóstico, debido a los factores como ciclo menstrual (31,9), estrés ( 3 ), nutrición (53) y el efecto de algún medicamento, pueden jugar un papel en la discrepancia de los resultados reportados en la literatura (35).

También la importancia en la diferencia al escoger el sustrato, concentración del sustrato, pH, buffer, anticoagulante y métodos de ajuste en la actividad de monoamino-oxidasa (MAO) son algunos de los factores que podrían alterar los resultados.

A continuación se mencionarán los métodos que son los más comúnmente usados por algunos autores por su altos rendimientos.

FALLA DE ORIGEN

### 6.1.- JACKMAN et al. 1980.

El método de Jackman se basa en hacer una comparación en la determinación utilizando la cuenta de plaquetas y proteínas plaquetarias.

El método de separación de plaquetas ya se mencionó con anterioridad en los métodos de separación de plaquetas.

Con respecto al método de proteínas plaquetarias se hace como sigue:

#### METODO.

Cuatro ml del FRP se centrifugan a 2400 g por 10 minutos, produciendo el coágulo de plaquetas. El sobrenadante fue desechado y el coágulo lavado con 1 ml de solución salina fría, se agregaron 0.4 ml de agua destilada, y se aislaron en 10 sec. En el experimento inicial, las plaquetas fueron electrónicamente contadas antes y después del aislamiento. Las cuentas de plaquetas decrecen por 98 ± 1.9% (N=11) reflejada en la completa distribución de plaquetas en la separación.

Ambas muestras tanto de conteo de plaquetas como proteínas en plaquetas para el ensayo de MAO se siguen por el método de Muihy et al. 1976.

#### RESULTADOS.

El significado de la actividad de MAO plaquetaria usando el método de conteo de plaquetas fue de  $6.89 \pm 1.66$  unidades por 10 muestras obtenidas en un día y  $7.07 \pm 1.83$  unidades por 10 muestras obtenidas a los siete días después. Si embargo, el significado de MAO en la determinación de proteínas fue de  $63.5 \pm 21.0$  unidades por 10 muestras de un día y  $59.8 \pm 15.9$  unidades por 10 muestras obtenidas a los siete días.

El coeficiente de correlación en la determinación de la actividad de MAO por el método de proteínas en plaquetas y el método de conteo de plaquetas, ambos en periodos de 1 a 8 días fue de 0.775 y 0.762, respectivamente ( $p < 0.01$ ).

El significado de C.V (coeficiente de variación) en el método de conteo de plaquetas por 1 a 8 días es de 2.97% ± 2.47% y 2.91 ± 1.74% respectivamente. Ambos valores son significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que lo correspondiente al C.V de 1 al 8° día, 5.62% ± 4.35% y 5.43% ± 3.89% respectivamente, obtenidos por el método de proteínas en plaquetas.

El I.C.C (correlación intraclass) por todo un día o por los ocho días es altamente significativo y virtualmente idéntico para ambos métodos (0.979 y 0.981 por conteo de plaquetas y 0.970 y 0.952 para proteínas en plaquetas) El ICC está basado en el significado del split duplicado por 1 a 8 días del estudio fue considerado mejor por el conteo de plaquetas; 0.852. Sin embargo, ambos fueron significativos a el nivel 0.01.

En un estudio comparativo para determinar la cantidad de muestra utilizada para conteo de plaquetas fue de 28.5% - 12.7% menor a la cantidad de muestra para el usado en proteínas en plaquetas.

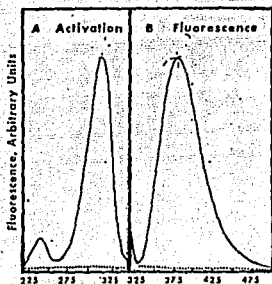
6.2.- KRAJL MICHAEL et al. 1995.

Es un método simple y muy rápido de Wiessbach basado en fotometría. Usando como sustrato kinuramina que desaparece a una densidad óptica de 360  $\mu\text{m}$ , en un recorrido espectrofotométrico.

En el laboratorio este método establece que es conveniente para atestiguar los efectos de inhibidores de MAO. Tanto in vivo como in vitro de enzimas MAO de hígado y cerebro.

Este método adaptado de Weissbach fluorométricamente provee alta sensibilidad y es muy conveniente a la actividad de MAO.

En lugar de determinar la desaparición de kinuramina, en un monitor fluorométrico puede aparecer 4-hidroquinoleína (4-HOQ) presentandose una ciclización espontánea del intermediario que es el aldehído formado por la desaminación oxidativa de kinuramina. La activación y fluorescencia de kinuramina y 4-HOQ en NaOH 1 N se expresa en la figura.



En una activación de  $315\mu\text{m}$ , la 4-HOQ exhibe una interesante fluorescencia máxima de  $380\mu\text{m}$ . Bajo estas condiciones un exceso mayor a 10 veces de kinuramina, no se aprecia fluorescencia.

#### METODO.

La incubación fue llevada como sigue: A 1ml de enzima (un tejido homogéneo acuoso) se le adiciona 0.05 ml de kinuramina (100  $\mu\text{g}$  kinuramina dihidrobromida) 0.5 ml de buffer de fosfatos (0.5M, pH 7.4) y 3ml de agua.

Se incubó 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  como la fase acuosa, se adicionan 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. La proteína precipitada fue suspendida.

A 1ml de sobrenadante se le agregan 2 ml de NaOH 1 N. La solución fue activada a  $315\mu\text{m}$  y la fluorescencia midió  $380\mu\text{m}$  o un recorrido de 320 a  $450\mu\text{m}$ .

Los blancos y 4-HOQ estandar se llevaron hasta el final del procedimiento.

Un 4-HOQ estandar de  $10\text{m}\mu\text{M}$  (1.99  $\mu\text{g}$ ) da un valor de fluorescencia arbitraria de  $77 \pm 2$  unidades y bajo estas condiciones los valores de blancos son  $\sim 1$  unidad; y 4-HOQ nos da solamente 1/4 de fluorescencia obtenida en NaOH de 1N.

Esto no es debido a la pérdida de la absorción en el precipitado de proteínas, ni por la pérdida de extracción de tejido ni por kinuramina, aun estos efectos son mínimos.

Para la pérdida de TCA causa un cambio del 5% en la fluorescencia de 4-HOQ. Como el 4-HOQ estandar nunca ha variado más de 2 unidades desde su valor promedio de 77, la fluctuaciones del TCA en la práctica son mínimas.

El TCA ha sido retenido como agente desproteinizador porque es permitir el ensayo de MAO.

### 6.3.- MURPHY D. L. et al. 1976.

Este método se basa en determinar si hay variación en determinar MAO plaquetaria y en plasma amino oxidasa, en 680 individuos.

#### MÉTODOS.

Se hizo un análisis comparativo combinando amino-oxidasa en plasma y monoamino- oxidasa plaquetaria.

El sustrato fue preparado usando (metileno-<sup>14</sup>C) benzilamina HCl (4.0 mCi/m moles), combinandolo con un nivel radiactivo de benzilamina HCl en 0.01 N de HCl con una actividad específica de 2.0 mCi/m moles.

El sustrato se lava con 15-20 ml de tolueno hasta que el contenido del extracto de tolueno sea constante.

Este procedimiento elimina de 0-15% de la radiactividad del sustrato.

A cuatro alícuotas de PRP de 0.25 ml que contienen  $10^8$  plaquetas de donde a dos alícuotas se le adiciona pargilina HCl  $4 \times 10^{-4}$  M e incubados a 37°C por 15 minutos.

Posteriormente se le adiciona 0.25 ml de una mezcla de buffer (0.2 M de trifosfato pH 9.1) y  $4 \times 10^{-4}$  M de benzilamina.

Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se terminó la reacción por la adición de 50µl de HCl 3N.

15 minutos después se agregaron 3 ml de heptano en cada uno de los tubos y se agitaron 5 minutos.

Se centrifugan a 2000 g por 10 minutos y se colocan en un baño de hielo y alcohol. Las capas acuosas fueron congeladas y la capa de heptano fue vertida en 10 ml de acuosol.

La interacción estudiada en 10 individuos fue de 95-97%. La formación del producto se determina por espectrómetro de centelleo comparada cada uno con un estándar externo.

Los resultados de la reacción pueden compararse con blancos de salina y controles tratados previamente con HCl 3 N y preincubados.

La pargilina a la concentración usada no afecta la actividad de plasma amino oxidasa sin embargo, hay total inhibición de MAO plaquetaria. Esta puede calcularse con la diferencia entre el producto formado de las alícuotas tratadas con pargilina y aquellas que no se uso inhibidor.

La actividad de MAO plaquetaria se expresa por n moles/ $10^8$  plaqueta/hr/plaqueta, y plasma amino-oxidasa por n moles/ml/hr/plasma.



## ENSAYO DE MAO PLAQUETARIA.

Los gránulos de plaquetas aisladas se lavan aproximadamente 10 segundos en 0.1 ml de agua destilada/ml de PRP original y se distribuyen en alícuotas de 50 $\mu$ l que contienen de 0.2 a 0.5 mg de proteínas.

Las alícuotas se incuban a 37°C con 0.5 ml de buffer de fosfatos 0.08 M con pH 7.2 [<sup>14</sup>C] triptamina (preparada bisuccinato de triptamina) 47 mCi/n moles y triptamina HCl. La concentración final es de  $8 \times 10^{-6}$  M.

La reacción fue determinada después de 20 minutos con la adición de 50 $\mu$ l de ácido perclórico al 60% esta se coloca en un baño de hielo.

El producto fue extraído en 4.5 ml de tolueno (lavado previamente con buffer de fosfato 0.08 M con pH 7.2) y con agitación por centrifugación y refrigerado.

Determinándose la concentración en el espectrofotómetro de centelleo.

## RESULTADOS:

Comparando el PRP del ensayo usado [<sup>14</sup>C] bencilamina y plaquetas contenidas con [<sup>14</sup>C] o bajo el ensayo de triptamina o la determinación de proteínas plaquetarias produce un coeficiente de correlación por la actividad de MAO plaquetaria de 0.85 ( $p < 0.001$ ,  $N = 48$ ) muy similar a la correlación previa observada de 0.89 ( $p < 0.001$ ,  $N = 75$ ) obtenida de una comparación de triptamina con bencilamina como sustratos.

Las actividades específicas con bencilamina como el sustrato es aproximadamente 10 veces más alto ( $48.6 \pm 5.4$  n moles/mg de proteína/hr) y aquellos obtenidos con triptamina como sustrato ( $5.03 \pm 0.72$  n moles/mg de proteína/hr,  $N = 12$ ).

El contenido de plaquetas está muy relacionado con la determinación de proteínas en plaquetas ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.001$ ,  $N = 49$ ).

En los resultados de la ecuación de la línea de regresión derivada de 48 pares de comparación en actividad de bencilamina-tiramina o triptamina se puede ver que la bencilamina del PRP ensayado así como el de triptamina-proteína son equivalentes:

$$B = 2.32 T + 1.18 \text{ donde}$$

B = PRP - bencilamina evaluado y

T = Triptamina valuada.

El producto del ensayo en PRP puede identificarse como benzaldehído, basándose en una característica espectrofotométrica a 242 nm y al identificar con un estándar de bencilamina; se observa que no hay formación del ácido benzóico. El producto del ensayo de triptamina fue identificado como indolacetaldehído basándose en resultados cromatográficos.

## II. DISCUSION.

Estudios hechos por Mc Donald sugieren que hay una disminución en el tamaño de plaquetas durante su tiempo de sobrevivencia en el torrente sanguíneo. El decremento en tamaño y cambios en su composición bioquímica hace suponer que las plaquetas sufren un proceso de maduración o envejecimiento mientras están circulando. En un experimento hecho por Karpatkin en el que se separó dos poblaciones de densidad media demostró que las plaquetas más pesadas tienen un potencial metabólico mayor y sugiere que pueden ser las plaquetas jóvenes las cuales progresan o envejecen con la edad a plaquetas más ligeras y chicas con disminución del potencial metabólico. La población de plaquetas más grandes y pesadas contiene más glicógeno, ortofosfato, ATP, AMP, y proteínas comparada con la población más ligera-pequeña, cuando son expresadas en gramo por peso húmedo o por mililitro de plaquetas empacadas. Estas propiedades proporcionan a las plaquetas grandes y pesadas una ventaja metabólica con respecto al mantenimiento de gradientes catiónicos, los cuales requieren energía y mantienen su forma discoidal también para desarrollar una función metabólica. Esta suposición es apoyada por el hecho de que las plaquetas grandes son considerablemente más resistentes a la lisis osmótica. Si se considera a una plaqueta como una esfera (actualmente es el intermedio de una esfera y un disco), una plaqueta más grande tendría menos área superficial por unidad de volumen que una plaqueta chica (por ejemplo el área superficial de una esfera, que aumenta con el cuadrado del radio por lo tanto el volumen aumenta con el cubo del radio). Consecuentemente una plaqueta grande tendría más adenin nucleotido por área superficial para una actividad de ATPasa que una plaqueta pequeña con la misma cantidad de adenin nucleotido por unidad de volumen. Todos estos datos sugieren que las plaquetas grandes-pesadas son jóvenes, y son las que se liberan de la médula ósea, mientras que las pequeñas-ligeras son las viejas siendo que ya llevan varios días en circulación. Además de la heterogeneidad metabólica de las plaquetas humanas apoya la tesis de que las plaquetas mueren por senectud antes de que sean destruidas.

Existen considerables evidencias de que las plaquetas varían en peso, tamaño, actividad glicolítica, densidad y contenido de proteínas. También se ha observado que hay diferencias en la actividad de MAO cuando las plaquetas se han separado en subpoblaciones con gradientes de densidad. Las plaquetas más jóvenes que son las más pesadas tienen una actividad de MAO más alta que las plaquetas más ligeras o viejas. Subpoblaciones de plaquetas las cuales difieren en actividad de MAO se han obtenido por medio de densidad con gradientes de densidad media o repetidas centrifugaciones del PRP con incrementos de los valores de "g".

Friedhoff separó las plaquetas en 5 fracciones de diferentes densidad y observó que la fracción más pesada tuvo una actividad de MAO de 15 veces más alta y 18 veces más alta en contenido de proteínas que la fracción más ligera. El análisis de subpoblaciones de plaquetas muestra que hay una diferencia significativa en tamaño de las plaquetas ligeras y pesadas. El porcentaje más alto de ambas partículas y el total de proteínas plaquetarias es también asociado con fracciones ligeras.

El método de separación de plaquetas que describe Friedhoff mediante centrifugaciones de diferente densidad para obtener fracciones de plaquetas, excluye las plaquetas grandes y pesadas que quedan atrapadas en las células rojas y en la capa intermedia del suero (PRP) y células rojas.

Estos métodos que emplean centrifugaciones de densidad media son eficientes para subdividir poblaciones de plaquetas pero pueden ser una fuente de error debido a que no han sido empleados en estudios de MAO en pacientes psiquiátricos. El análisis estructural muestra que las plaquetas pesadas contienen más granulos que las plaquetas ligeras, un sistema canicular menos prominente y un número equivalente de mitocondrias. Las plaquetas jóvenes o pesadas tienen un promedio de sobrevivencia mucho más grande que las plaquetas ligeras 313.6 horas contra 74.6 horas. Friedhoff, Miller y Karpatkin separaron plaquetas de acuerdo a diferentes densidades y mostraron que hay una diferencia de 2 a 5 veces en la actividad de MAO entre subfracciones más ligeras y pesadas. Las plaquetas más pesadas contienen una actividad plaquetaria específica más alta.

En el método de centrifugación diferencial, la fuerza "g" multiplicada por el tiempo del paso inicial de centrifugación es el principal factor que determina el tipo o densidad de plaquetas obtenido en el paquete final y así la actividad específica de MAO.

Hay por lo menos otros 4 factores que interaccionan con el método de centrifugación diferencial para dar resultados erróneos o variables: Las plaquetas preparadas a temperatura ambiente, esto es debido a que el frío causa plaquetas densas que se fijan en la capa intermedia con células blancas o linfocitos. Un segundo factor es la contaminación del paquete de plaquetas con proteínas del plasma, el cual interfiere en la determinación y cálculos de proteínas y por lo tanto se obtendrán valores erróneos. La mayoría de los métodos que se han revisado simplemente enjuagan el paquete intacto en el fondo del tubo quedando residuos de grandes contenidos de proteínas plasmáticas. Igual sucede en en los métodos donde se resuspende el paquete de plaquetas, un gran porcentaje de plaquetas quedan aglutinadas y quedan atrapadas proteínas plasmáticas. El tercer factor es la contaminación de células rojas y blancas en la preparación de plaquetas esto sería un problema serio, especialmente cuando se ha mostrado que los linfocitos contienen MAO. A bajas fuerzas de "g" hay siempre un intercambio entre la recuperación de plaquetas más densas y contaminación con linfocitos. El factor final es que la distribución y densidad de plaquetas no son uniformes en todos los individuos. Además en el método de centrifugación diferencial, la recuperación de plaquetas más densas varía de individuos a individuos.

Corash (1974 y 1977) menciona que para la separación de plaquetas a partir del total de sangre, las primeras técnicas requerían del uso del plasma rico en plaquetas (PRP), en esta preparación se tienen pérdidas del 20 al 40 % de la población de plaquetas, siendo que esta población de plaquetas esta compuesta de plaquetas grandes y pesadas con actividades metabólicas incrementadas. Mediante este método se obtiene un porcentaje mayor del 95% de la población de las plaquetas, que utiliza la centrifugación de densidad boyante y soluciones isosmóticas de Stractan que es un polisacárido de arabini-galactano. El análisis de distribución del tamaño de plaquetas demuestran que la población de plaquetas grandes excluidas por la técnica del PRP es retenida por el método de Stractan.

FALLA DE ORIGEN

Este método fue desarrollado para aislar y fraccionar poblaciones de plaquetas en subpoblaciones dependientes de la densidad.

Las plaquetas obtenidas por este método están libres de proteínas plasmáticas y se agregan normalmente al ADP y ristocetina. El otro método de Corash (1980) evita muchos de los problemas anteriores. Este procedimiento da un 98% de rendimiento de recuperación de la población de plaquetas sin contaminación de proteínas plasmáticas y virtualmente sin células rojas o contaminación de leucocitos.

La sangre se trata directamente, esto es, se lava cinco veces con solución buffer isotónica y se centrifuga a 700 g obteniendo el paquete final de plaquetas a una fuerza "g" de 1500 durante 20 minutos. Cada paso de este procedimiento ha sido cuidadosamente diseñado de tal forma que las plaquetas permanezcan fisiológicamente intactas y no se aglutinen y atrapen proteínas plasmáticas.

Existe otro método que utiliza la centrifugación diferencial convencional implementada por Vargas y Moncada (1982). El paquete de plaquetas se aísla mediante centrifugaciones de 350 y 250 g en las que separa primero el plasma rico en plaquetas (PRP) al cual se le añade un potente inhibidor de plaquetas que es la prostaciclina  $PGI_2$  que evita la gregación de esta estructura hemática, el botón de plaquetas se recolecta a 2100 rpm, lavándose dos veces con una solución de tirode que contiene suero de albumina de bovino y la prostaciclina. A este paquete final de plaquetas se le determina la actividad de MAO.

Otro de los problemas que es independiente a la separación de plaquetas y que da resultados erróneos en la actividad de MAO es la forma de expresar la concentración de esta actividad.

Existen dos maneras de reportar la actividad de MAO que son: nmoles de producto/hr/mg de proteína y nmoles de producto/10<sup>6</sup> plaquetas.

La determinación de la actividad de MAO en plaquetas aisladas del PRF aunada con la determinación de proteínas totales en plaquetas conteniendo otras sustancias nitrogenadas se expresa en actividad de MAO por mg de proteína.

El potencial de error en esta forma de expresión de concentración es de consideración porque no solamente son proteínas de plaquetas sino que pueden ser compuestos nitrogenados que se valoran como proteínas dando valores erróneos. Estas proteínas no plaquetarias pueden ser incluidas en el paquete de plaquetas durante su recolección. La actividad de MAO como una función del conteo de plaquetas es el método alternativo que se ha usado y que da resultados más confiables para expresar su concentración. Inclusive hay diferencias entre una técnica y otra en la actividad de MAO y estas pueden ser debidas a los diferentes parámetros del procedimiento mismo, tal como el sustrato utilizado, la fuerza centrífuga "g" y temperatura.

Jackman hace una comparación empleando conteo de plaquetas y proteínas de plaquetas. De los cuales obtuvo la evidencia de que es más seguro y confiable el método de conteo de plaquetas que el de proteínas en plaquetas. El descenso que existe en el método de proteínas en plaquetas puede ser debido por el coágulo de plaquetas contenidas en las células rojas, y células blancas de sangre.

Además en los resultados se indica que hay una pérdida en la actividad de MAO en proteínas, esto puede reflejar un perjuicio por el aislamiento, o porque en el lavado haya pérdida de proteínas, o por la ausencia de un activador del plasma durante la formación del coágulo. Nada de esto se presenta en el método de conteo de plaquetas.

El procedimiento que siguió Jackman para la determinación de la actividad de MAO es muy similar al propuesto por Murphy en el cual se hace una determinación primaria de amino oxidasa en plasma, utilizando bencilamina como sustrato combinandolo con pargilina el cual es un inhibidor de la forma B de MAO y como se ha venido diciendo es la forma que presentan las plaquetas, por lo que hay total inhibición de Mao plaquetaria. El producto se obtiene por medición de las muestras por espectrofotometría de centelleo. Para determinar la actividad de MAO en plaquetas se debe medir la amino oxidasa en plasma corroborarla con las muestras que no se les adicionó pargilina por lo que no es muy confiable el resultado obtenido.

Analizando otro de los métodos comúnmente usados establece un procedimiento que evita los problemas de los anteriores, este es el método de Krajl ya que su fundamento esta basado en microfluorimetría en el cual sólo la desaparación del sustrato que en este caso es kinuramina y la formación del producto que sería 4-hidroxiquinoleína (4-HOQ) que se detecta en el aparato a 380  $\mu\text{m}$ .

FALLA DE ORIGEN



### III. CONCLUSIONES.

Estudios anteriores demuestran que la heterogeneidad de las plaquetas, es en parte dependiente de la edad y la relación de densidad fluctuante esto es importante en la preparación de las plaquetas. Se ha mostrado que el promedio de rendimiento de plaquetas obtenidas mediante la separación primaria del plasma rico en plaquetas bajo condiciones estandares es aproximadamente del 75% del total de las plaquetas presentes en la sangre. Por medio de esta técnica se tienen perdidas del 20 al 40% de la población total de plaquetas como se menciono anteriormente. Una población de plaquetas mayor del 95% de la sangre total se aísla centrifugando esta con una solución isosmótica de Stractan (arabino-galactano).

Los análisis de distribución del tamaño de plaquetas demuestran que la población de plaquetas pesadas-grandes excluidas por la técnica del PRP es retenida por el método de Corash (1980).

El método de Corash (Schizophrenia Bulletin 1980) muestra una variación significativamente baja comparada con otros métodos comunmente empleados. Al igual, el coeficiente de correlación del interensayo para muestras corridas el mismo día fue de 0.99 (n=14) y el ICC para muestras corridas en diferentes días fue de 0.94 (n=26).

Recientemente se ha discutido que existen diferencias entre un individuo y otro con respecto a la distribución de plaquetas en gradientes de densidad. Corash encontró que este factor interacciona con el método de centrifugación diferencial para dar un error arriba de 8 a 10 veces en la determinación de la actividad de MAO. Por ejemplo con el método de centrifugación diferencial se encontró que la actividad de MAO de un paciente fue de  $2.5 \pm 0.13$  (SEM) (n=14). Sin embargo, la misma muestra procesada por el método de Corash presentó una actividad de  $21.4 \pm 1.11$ .

También la diferencia en el porcentaje en actividad para muestras procesadas por estos dos métodos no es constante y varía considerablemente de individuo a individuo.

De los métodos mencionados para la separación de plaquetas a partir de la sangre total, las dos técnicas que se describen al principio y que pertenecen a Corash (1974 y 1977) se obtienen buenos porcentajes de rendimiento y separa subpoblaciones de plaquetas con soluciones de Stractan centrifugado con gradientes de densidad media, obteniendo plaquetas libres de eritrocitos y leucocitos.

Esta técnica resulta bastante costosa por el valor elevado de las soluciones, material y equipo utilizado.

Con el método de Corash (1980) se obtiene un 98% de rendimiento y utiliza en lugar de Stractan una solución buffer de lavado de pH 7.4 que es la que se agrega a la sangre directamente y se somete a una serie de centrifugaciones y lavados para obtener el paquete final de plaquetas todo procesado a temperatura ambiente.

El método de Fritz (1986) al igual que el de Corash presenta ligeras modificaciones tales como los valores de la velocidad de centrifugación, tiempo de centrifugación y temperatura.

Un último método que utiliza centrifugación diferencial convencional y que hace uso de las prostaciclina es que desarrollaron Vargas y Moncada (Prostaglandinas 1980). En este método primero se separa el plasma rico en plaquetas (PRF) y a este se le añade la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que es un inhibidor de agregados de plaquetas, desechando el paquete celular rojo y el plasma rico en plaquetas se somete a varias centrifugaciones y lavados adicionando en cada paso la prostaciclina, finalmente se centrifuga a 2500 rpm para obtener el paquete de plaquetas a 20°C al que se le determina la actividad de MAO.

Finalmente se mencionará una técnica que en particular propondremos y queda sujeta a numerosos estudios y ensayos para determinar sus parámetros de control de calidad, esta es una combinación del método de Corash-Fritz en que se obtiene un plasma rico en plaquetas diluido y Moncada que utiliza la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>).

A 40 ml de sangre venosa se le añaden 2.8 ml de citrato trisódico al 4% + 0.2 ml de heparina (5,000 U/ml), se mezclan girando suavemente. A esta solución se le añade 9.0 ml de Tirode-BSA que contiene PGI se mezcla y centrifuga a 1000 rpm durante 15 minutos sin alto. El PRP diluido se mide y transfiere a un tubo. Al paquete celular rojo se añaden 18 ml de solución amortiguadora o tirode con 3.0  $\mu$ l de PGI por cada 10 ml de PRP, se mezcla y se centrifuga a 700rpm por 10 minutos se separa este lavado y se junta con el primer PRP, este proceso de lavado se repite dos veces más reuniendo todos los lavados a los cuales se les añade 15  $\mu$ l de PGI y centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos sin alto a 20°C. Se desechan el paquete celular rojo y el sobrenadante de donde se recolectó la apstilla de plaquetas.

Esta pastilla se resuspende en 20 ml de solución de tirode-BSA con 15  $\mu$ l de PGI y se centrifuga a 1900 rpm durante 10 minutos este paso se vuelve a repetir una vez más para recolectar el paquete de plaquetas en un tubo de plástico y conservarlo en el congelador a -80°C para posteriormente determinar la actividad de MAO.

Con respecto a la forma de reportar y expresar la concentración de la actividad de MAO plaquetaria, resulta más confiable y exacta reportaría en función del conteo de plaquetas debido a que aquí nada más se determina el número de plaquetas tomando una alícuota de la suspensión de plaquetas con PGI<sub>2</sub> y se lee directamente en el contador electrónico, comparado con el reporte de mg de proteínas ya que estas se determinan del botón de plaquetas que quedan después de terminar la reacción de MAO. Y para llevar a cabo esta última se toma una alícuota de la suspensión del concentrado de plaquetas el cual se obtiene de una serie de centrifugaciones y lavados en los que existe más riesgo de pérdida de muestra y contaminación de eritrocitos, leucocitos y proteínas no celulares o plasmáticas, por lo tanto esto conducirá a obtener valores erróneos.

De acuerdo a los métodos que comunmente son utilizados para la determinación de la actividad de MAO a nuestro criterio nosotros proponemos que el más confiable, y con un mínimo de error del 2% es el de Krajl porque nos da las siguientes ventajas:

Una manipulación simple  
Menor tiempo y  
Mayor rendimiento.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- American Psychiatric Association : DSM III. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder. 3er. ed. AFA Press. Washington DC, 1980.
- 2.- Ashoka Prasad, Roy P. Rampling, Vivette Glover and Merton Sandler : Psychiatric Morbidity and Platelet Monoamine Oxidase Activity in Cancer Patients. Psychiatry Research 22: 111-116; 1987.
- 3.- Aster H. Richard.: Produccion de plaquetas. Homeostasis 125: 1060; 1970.
- 4.- Balon Richard M. Rainey John, Pahl Robert, Vikram K. Yeragani, F. Gregory Oxenkrug and B. Roy Mc Cauley.: Platelet Monoamine Oxidase Activity in Panic Disorder. Psychiatry Research 22: 37-41; 1986.
- 5.- Barber, A. J., and Jamieson, U. A.: Isolation and Characterization of Plasma Membrane from Human Blood Platelets.: Journal Biol. Chemical 245: 6357; 1980.
- 6.- Baron M., Risch N., Levitt M., Gruen. R.: Genetic Analysis of plasma amine oxidase activity in Schizophrenia. Psychiatry Res, 15:121-132; 1984.
- 7.- Behnke O.: Electron Microscopical Observations on the Membrane Systems of the Rat Blood Platelet.: Anatomic rec. 158: 121; 1967.
- 8.- Behnke O.: Electron Microscopical Observations on the Surface Coating of Blood Platelets.: Journal Ultrastructure Res. 24: 51; 1968.
- 9.- Belmaker KH, Muyphey DL, Wyatt RJ, Loria JX: Human Platelet Monoamine oxidase changes during the Menstrual cycle. Arch. Gen Psychiatry, 31:553-556;1984

- 10.- Blaschko, H. Richter, D. & Schlossmann, H.: The Oxidation of Adrenaline and Other Amines. *Biochemical Journal*. 31: 2187-2196; 1967.
- 11.- Bull B.S. and Zucker, M. B.: Changes in Platelet Volume produce by Temperature, Metabolic Inhibitors, and Aggregating Agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Medicine*. 120: 296; 1965.
- 12.- Cambell I.C.: Blood Platelets and Psychiatry. *British Journal Psychiatry*. 138: 78-80; 1981.
- 13.- Collins & Sandler.: Human Blood Platelet Monoamine Oxidase: Purification human and Characterization. *Biochemical Pharmacology* 20: 289-296; 1981.
- 14.- Corash, L. Tan, H. and Galnick.: Blood 49 No. 1 Separation of platelets 1977.
- 15.- Corash Laurence. Platelets Heterogeneity: Relevance to the use of Platelets to estudy Psychiatry Disorders. *Schizophrenia Bulletin* 6: 254-258; 1980.
- 16.- Crout, J. R.: Chatecholamines in urins. In "Standard Methods of Clinical Chemistry" (Seligson, D. ed.) Vol. 3; 62; Academic Press New York 1981.
- 17.- Davison JRT, McLeod MN, Turnbull CD, White HL, Fever EJ,: Platelet Monoamino Oxidase Activity and the Classification of Depression. *Arch. Gen Psychiatry*. 37:771-773; 1980.
- 18.- Dias, J. L.: Como actúan los fármacos antidepresivos?. *Salud Mental* 11-1: 63-75; 1988.
- 19.- Drill.: *Farmacología Médica* 30: 560-561; 1986.
- 20.- Ebbe, S., and Stohlman, F.: Megakaryocytopoiesis in the Rat. *Blood* 26: 20; 1965.

FALLA DE ORIGEN

- 21.- Elliot J. M.: Platelet Receptor Binding Studies in Affective Disorders.: Journal of Affective Disorders. 6: 219-239; 1984.
- 22.- Fowler CJ, Tipton KF, Mac Kay aup, Youdim MBH: Human Platelet Monoamine Oxidase A useful enzyme in the study of Psychiatric Disorders?. Neuroscience. 17:1557-1594; 1982
- 23.- Friehoff Arnold J., Miller Jeannette C. nad Karpatkin Simon.: Heterogeity of Human Platelets. VII. Platelet Monoamine Oxidase Activity in Normals and Patients With Autoimmune Thrombocytopenic Purpura and Reactive Thrombocytosis: Its Relationships to Platelet Protein Density. Blood Vol. 51.No. 2;1978.
- 24.- Fritz Richard. R., Creed W. Abell. M. Richard, Denney. B. Denney Constance. J. David Bessman. J. Alexander Boeringa, and M. Robert Rose.: Psychiatry Research 17: 129-140; 1985
- 25.- Georgotas A, Mc Cue RE, Friedman E, Hapwort WE, Kim OM, Cooper TB, Chang I, Stokes PE.: Relationship of platelet MAO activity to characteristic of major depressive illness: Psychiatry Res. 19: 247-256; 1986.
- 26.- Gilmour. T. R.: Normal Haemopoiesis in intra-uterine and neonatal life Path. Bacteriology 52: 35; 1941.
- 27.- Gold M.S., Pearsall, H.K.: Platelet and Trait Markers. En: MS Gold, Pottash ALC (Eds.). Diagnostic and Laboratory Testing in Psychiatry. Clinical Issues in Psychiatry. Plenum Medical. Blook Company, New York and London, 87-98; 1986.
- 28.- Gorkin. V. Z. & Orekhovitch. W. N.: Monoamine Oxidase: New data on their nature, possible Biological Role and Specific Inhibition by Pharmaceutical Preparations. Biochemica Applicata. 14: 343; 1967 citado en: British Medical Bulletin 29 (2): 120-122; 1979.

- 29.- Gross, R., and Gerok, W.: Quantitative Determination of the Amino Acids and Other Innhydrin Positive Substances in Normal Human Platelets. *Thromb. Haemorrh.*, 6:462; 1981.
- 30.- Hall DWR, Logan BW, Parsons GH,: Further studies on the inhibition of Monoamine Oxidase by MeB 9302 (corgyline): Substrate Specificity in Various Mamalian Species. *Biochem Pharmacology*, 18:1447-1454:1969.
- 31.- Halman, J. L; Oreland, G. Edman and D. Schalling.: Thrombocyte Monoamine Oxidase Activity and Personality Traits in Womwn with severe Premenstrual syndrome.: *Acta Psychiatric Scand.* 76: 225-234:1987.
- 32.- Hare, M. L. C.: tyramine Oxidase I. A new enzyme system in liver.: *Biochemical Journal*, 22: 968-979; 1928. Edited by E. Costa and M. Sandler Raven. Press. New York, 1979.
- 33.- Houslay MD, Tepton KE.: Multiple Forms of Monoamine Oxidase: Fact and Artefact. *Life Science*. 19: 467-478; 1976.
- 34.- Jackman Herbert, Ramesh Arora and Meltzer Herbert Y. Ramesh and Meltzer *Clinical Chemical Acta* 96:15-23:1979.
- 35.- Jackman Herbert, L., and Meltzer Herbert Y.: Schizophrenia Bulletin Vol.8 N°.2 Factors Affecting Determination of Platelet Monoamine Oxidase Activity. 259-265; 1980.
- 36.- Jarrott, B., & Iversen, L. L.: Subcellular Distribution of Monoamine Oxidase Activity in Rat Liver and Vas deferens. *Biochemical Pharmacology* 17:1619- 1625; 1971.

PLANILLA DE ORIGEN



- 37.- Karpatkin, S., Charmatz, A., and Langer, R. M.: Glycogenesis and glyconeogenesis in Human Platelets. Incorporation of glucose, pyruvate and citrate into Platelet Glycogen. Glycogen synthetase and fructose 1-6 diphosphatase. J. Clin. Invest. 49:140; 1970.
- 38.- Karpatkin, S., and Strick N.: Heterogeneity of human platelets III. Glycogen metabolism in Platelets of different sizes. Brit. Journal Hematology 19: 135; 1970.
- 39.- Karpatkin, S.: Heterogeneity of human Platelets. I Metabolic and Kinetic evidence suggestive of young old platelets. Journal Clinical Invest. 47: 1073;1974.
- 40.- Klinteberg BAF, Schalling D, Edman G, Asberg, M.: Personality Correlates of Platelet Monoamine Oxidase (MAO) Activity in females and males Subjects. Neuropsychobiology.18: 89-96; 1987.
- 41.- Knorring L. Von, Oreland L., Knorring A.L. Von.: Personality traits and Psychopathology Biol.Psychiatry 530-532 1985.
- 42.- Knorring L Von, Oreland L, Winbland B: Personality Traits related to Monoamine Oxidase Activity in Platelets. Psychiatry Res, 12: 11-26; 1984.
- 43.- Kerry, T., Yasunobu & Susumu OI: Mechanistic Aspects of the Bovine Hepatic Monoamine oxidase Reactionin Advances in Biochemical Psychopharmacology, Vol. 5: 91-101 edited by E. Costa and M. Sandler Raven Press New York, 1979.
- 44.- Krajl Michael.: Biochemical Pharmacology A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase Vol.14:1683- 1685; 1965.

JE ORIGEN

- 45.- Leavell, B. S. and Thorup, D. A.: Hematology Clinical 4a Edition Interamericana, Mexico, 1978.
- 46.- Leslie, L. Iversen.: British Medical Bulletin vol. 6 No. 3 1977.
- 47.- Lewis Landsberg, M.D.: Clinics in Endocrinology and Metabolism Vol.6 No. 3 1977.
- 48.- Lidberg L., Modin I., Orelund I., Tuck J.R., Gillner A: Platelet Monoamine Oxidase Activity and Psychiatry. Psychiatry Res., 16:339-343; 1985.
- 49.- Llenares, E.: Departamento de Bioquímica del IPN - CINVESTAV Metodo modificado de Vargas J.R. y Moncada Prostaglandinas. 1983.
- 50.- Mann J.: Altered Platelet Monoamine Oxidase Activity in Affective Disorders. Psychological Medicine, 9: 729-736;1979.
- 51.- Meltzer Hy, Arora RC.: Skeletal Muscle MAO Activity in the Major Psychoses. Arch. Gen Psychiatry, 37:333-339; 1990.
- 52.- Miron Baron, M.D., Morton Levitt, Ph. D., Rhoda Gruen, M.S., John Kane M.D., and Lauren Asnis, M. S.: Platelet Monoamine oxidase Activity and Genetic Vulnerability to Schizophrenia. Am. Journal Psychiatry 141: 7 836-841; 1984.
- 53.- Murphy D. L., Wright C., Buchsbaum M., Nichols, A., Costa J. L., and Wyatt R. J.: Platelet and Plasma Amine Oxidase Activity in 680 Normals: Sex and Age Differences and Stability over time. Biochemical Medicine 16, 254-265; 1976.
- 54.- Murphy, D. L., Wyatt R. J.: New Contribution from Basic Science to Understanding the effects of Monoamine Oxidase Inhibiting Antidepressants. J. Clin. Psychiatry, 47:37-43; 1984.

- 55.- Nachman, R. L., Marcus, A. J., and Safier, L. B.: Platelet Thrombosthenin: Subcellular Localization and Function. *J. Clin. Invest.* 46: 1380; 1967.
- 56.- Nagatsu, T.: Biochemical of Chatecholamine the Biochemical Method. 121-124 University Park Press 1973.
- 57.- Nakao, K., and Angrist, A. A.: Membrane Surface Specialization of Blood Platelets and Megakaryocytes Nature (London) 217:960. 1978.
- 58.- Nara, S., Igave, I., Gomes B. & Yasunobu, K. L.: The prosthetic Groups of Animal Amine Oxidases. *Biochemical Biophys. Res. Commun.* 23:324; 1966.
- 59.- Novalés Castro X. J., Amato Martínez J.D.: Sistema Linfhemático UNAM IZTACALA 257-264; 1989.
- 60.- Oreland L., Fowler CL.: Monoamine Oxidase. En K Kamiko, E. Usdin, T. Nagatsu (eds). *Basic and Clinical Frontiers. Excerpta Medica.* Amsterdam, 312-320; 1982.
- 61.- Oreland L. Shaskan EG.: Monoamine Oxidase Activity as a Biological Marker *TIPS*, 239-241; 1983.
- 62.- Fleischer, A.: Metabolism Transfer and Storage of 5- Hidroxytryptamine in the Blood Platelets. *British Journal Pharmacology* 32: 1; 1978.
- 63.- Poirier MF, Loo H, Mitrani N, Benkelfat C, Askienazy s, Le furg G: Platelet MAO Activity in Clinical Subtypes of Depression and DST Suppression. *Acta Psychiatry Scand*, 75: 456-463, 1987.
- 64.- Rambourg, A., and Leblond, C.P: Electron Microscopic Observations on the Carbohydrate-rich cell coat Present at the Surface of cells in the rat. *J. Cell Biol.* 32: 27; 1967.

FALLA DE ORIGEN

- 65.- Ramesh C. Arora, Suman Sahai, Herbert Y. Meltzer.: Correlation Between MAOP Activity in Blood Platelets Obtained by single and Multiple Centrifugations. *Psychiatry Res.*, 8: 147-151; 1983.
- 66.- Rose RM, Castellani S, Boeringa JA, MaleKahmadi P, Lankford DA, Fritz RR, Denney CB, Denney RM, Abell CW.: Platelet MAO Concentration and Molecular Activity: II. Comparison of Normal and Schizophrenic Populations. *Psychiatry Res.*, 17:141-151; 1986.
- 67.- Samson JA, Gudeman JE., Schatzberg AF, Kizuka FP, Orsulak PJ, Cole JO, Schildkraut JJ.: Toward a Biochemical Classification of Depressive Disorders VIII. Platelets monoamine Oxidase Activity in Subtypes of Depressions. *J. Psychiatry Res.*, 19: 547-555; 1986.
- 68.- Satake (1955) Sakinno Kosokazaku, 4:39. Citado Monoamine Oxidase New Vistas. Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5,67 edited by E. Costa and M. Sandler. Raven Press New York 1972.
- 69.- Schwartz MA, Wyatt RJ, Yang HT, Neff NH: Multiple Forms of Brain Monoamine Oxidase in Schizophrenic and normal individuals. *Arch Gen Psychiatry.*, 31: 557-560; 1984.
- 70.- Spivak, J.L.: Fundamentals of Clinical Hematology, 2a. ed., Ed. Harper & Row Philadelphia; 1984.
- 71.- Suzuki O., Yagi K.: Multiple Forms of Monoamine Oxidase in the human cerebral cortices at different ages En: A Vernadakis, E. Gracobini, G. Filagamo (eds). *Muturation of Neurotransmission.* Karge Basel Plublshers, Sulza 100-107; 1978.
- 72.- Tachiki KH, Buckman TD, Eidusons, Kling AS, Mullett J.: Phosphatidylserine inhibition of Monoamine Oxidase in Platelets of Schizophrenics. *Biol. Psychiatry.*, 21: 59-68; 1986.

- 73.- Till J.E., and McCulloch E. A.: A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Res.*, 14:213; 1981.
- 74.- Tripton, K. F.: Some Properties of Monoamine Oxidase. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 5: 11-24, edited by E. Costa and M. Sandler. Raven Press N.Y. 1972.
- 75.- Vargas JR, Radomski, M. and S. Moncada: *Prostaglandins* 23, 929-945; 1982.
- 76.- Weiss HJ.: Platelets Physiology and Abnormalities of Platelet Function. *N. Eng. Journal Medicine*, 293: 231-541; 1985.
- 77.- Weiss HJ.: Platelets Physiology and Abnormalities of Platelet Function. *N. Eng. Journal Medicine*, 293: 580-588; 1985.
- 78.- Whang, J., Frei, E., III, Tjio, J.H., Carbone, P.P., and Brecher, G.: The Distribution of the Philadelphia Chromosome in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* 22: 664; 1993.
- 79.- Wise, David., Potkin Steven, Bridge, P.: *Schizophrenia Bulletin* Vol. 8 No. 2 ; 1980.
- 80.- Wood K., Coppen A.: Platelet Transport and Receptor Sites in Depressive illness. En: S. D. Iversen (ed). *Psychopharmacology Recent Advances and Future Prospects*. (A British Association for Psychopharmacology). Monograph, No.61 Oxford Medical Publications, Oxford, 21-32; 1985.
- 81.- Wyatt RJ, Murphy DL, Belmarker R, Cohen S, Donnelly CH, Pollin W.: Reduced Monoamine Oxidase Activity in Platelets: A Possible Genetic Marker for Vulnerability to Schizophrenia. *Science*, 179:916-918; 1973.

- 82.- Wyatt R.J., Potkin, SG., Murphy D.L.: Platelet MAO Activity in Schizophrenia, a review of data. Am J. of Psychiatry, 136: 377-386; 1979.
83. Young WF Jr., Laws ER Jr., Sharbrough FW, Weinshilboum KM.: Human Monoamine Oxidase. Lack of Brain and Platelet Correlation. Arch Gen Psychiatry 43: 604-609; 1986.
- 84.- Zeller, E.A. & Barsky, J.: In vivo inhibition of Liver and Brain Monoamine Oxidase by 1-isonifinyl-1-2-1 sopropylhydrazine. Proceedings of the society for experimental biology and medicine 8: 459-461; 1952.
85. Zucker, M. B., and Borrelli, J.: Platelets as a Source of Normal Serum Acid Nitrophenylphosphatase. J. Clin. Invest. 38: 148, 1989.
- 86.- Zeller, E. A.: Über den enzymatischen Abbau Von Histamin und Diaminen 2. Mitteilung Helvetica Chimica. Acta, 21: 880-890: 1970.