



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL DE LAS MICROPARTÍCULAS PLAQUETARIAS EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: CAMILA MUÑOZ GONZÁLEZ
PROFESOR GUÍA: Dr. TM. MARCELO ALARCÓN**

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

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



Talca, 2019

DEDICATORIA

A mi madre Yaneth González Castillo y a mi hermana Javiera Muñoz González, los pilares de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Dr. TM Marcelo Alarcón por su buena disposición, por compartir sus conocimientos y por cada momento dedicado para aclarar mis dudas.

A mis amigos Daniela, Constanza, Moryn, Jordan, Camilo, Raúl y Leclee por siempre darme el apoyo y la confianza durante todo este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 5 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 4. MARCO TEORICO | 6 |
| 4.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER | 6 |
| 4.1.1 Epidemiología..... | 6 |
| 4.1.2 Fisiopatología..... | 7 |
| 4.2 PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE Y PEPTIDO β -AMILOIDE..... | 9 |
| 4.3 CALPAÍNA EN LA FORMACIÓN DEL PÉPTIDO A β 40 | 14 |
| 4.4 GENERALIDADES DE PLAQUETAS | 18 |
| 4.4.1 Activación plaquetaria | 20 |
| 4.5 MICROPARTÍCULAS | 21 |
| 4.5.1 Formación de micropartículas | 25 |
| 4.5.2 Actividad procoagulante de las micropartículas..... | 28 |
| 4.5.3 MicroARN asociados a micropartículas plaquetarias..... | 29 |
| 4.5.4 Micropartículas en el SNC..... | 31 |
| 4.6 MICROPARTÍCULAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER | 32 |
| 5. CONCLUSIÓN..... | 39 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Teoría centrada en el péptido β -amiloide en EA. | 8 |
| Figura 2. Cortes proteolíticos de APP. | 11 |
| Figura 3. Ovillos neurofibrilares y placas seniles en la corteza cerebral. | 12 |
| Figura 4 Calpaína en el contexto de la EA. | 16 |
| Figura 5. Mecanismos de vesiculación celular. | 22 |
| Figura 6 Formación de MP, cuerpos apoptóticos y exosomas. | 23 |
| Figura 7. Posible mecanismo de desprendimiento de micropartículas. | 27 |
| Figura 8. Modelo propuesto para la transferencia intercelular de microARN a otra célula del sistema circulatorio. | 30 |
| Figura 9. Representación de los efectos de micropartículas en el ensamblaje de $A\beta$ extracelular. | 33 |
| Tabla 1. Componentes de la membrana externa y de los gránulos plaquetarios. | 19 |
| Tabla 2. Propiedades físicas de las vesículas derivadas de membrana. | 24 |
| Tabla 3. Micropartículas derivadas de diferentes células en enfermedades del SNC. | 32 |
| Tabla 4. Resumen de artículos científicos considerados en esta revisión. | 40 |

1. RESUMEN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y es la principal causa de demencia entre los adultos mayores. Se ha visto que el proceso de activación plaquetaria contribuye a la inflamación mediante la liberación de diferentes moléculas, como las micropartículas, esto tiene por consecuencia la destrucción de células neuronales, y con ello la producción de enfermedades neuro-inflamatorias, en donde se incluye la enfermedad de Alzheimer.

Las plaquetas corresponden a fragmentos citoplasmáticos anucleados que circulan en la sangre en forma de disco biconvexo y poseen carga eléctrica negativa en su superficie. La mayoría de las MPs son de origen plaquetario, corresponden a vesículas lipídicas derivadas del retículo endoplásmico y membrana plasmática, que son liberadas por activación de estas células. Las MP plaquetarios pueden mediar efectos fisiopatológicos, participar en hemostasia, trombosis, inflamación, transferencia de infección maligna, angiogénesis e inmunidad al actuar como portadores intercelulares que suministran, proteínas bioactivas como citoquinas, ARNm, y también microRNAs a las células receptoras.

Es por esto que mediante la siguiente revisión bibliográfica se analizó documentación científica actualizada sobre el rol de las micropartículas plaquetarias en la enfermedad de Alzheimer

La evidencia revisada, indica que estas vesículas poseen sin duda una actividad proinflamatoria, pero no se ha logrado demostrar una real correlación entre sus niveles en plasma con el desarrollo de esta patología.

Palabras claves: micropartículas, plaquetas, Alzheimer, péptido β -amiloide, calpaína.

2. INTRODUCCIÓN

En 1967 Wolf demostró la presencia de un material coagulante en forma de pequeñas partículas en una muestra de plasma de un paciente normal. Este material originado por las plaquetas fue llamado en ese entonces como “polvo de plaquetas”. Actualmente se sabe que este polvo consiste en pequeñas vesículas denominadas micropartículas derivadas de plaquetas (1).

Las plaquetas son células anucleadas de 1–2µm de tamaño, originadas en la médula ósea por fragmentación de megacariocitos. Estas cumplen un rol fundamental en la hemostasia, uno de los sistemas de defensa más importante del organismo.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno (2). Un ejemplo de estas moléculas son las micropartículas.

Las micropartículas se definen como vesículas de 0,1-1 micras aproximadamente, que se expresan de las membranas celulares de las células activadas o apoptóticas y cumplen una importante función en la comunicación celular (3). Pueden ser liberadas por células sanguíneas, endoteliales y musculares lisas.

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa. Corresponde a la principal causa de demencia entre los adultos mayores, aumentando su incidencia a medida que se acrecienta la edad, y se caracteriza por una patogénesis compleja. Se ha visto que el proceso de activación plaquetaria contribuye a la inflamación mediante la liberación de diferentes moléculas, incluidas las micropartículas, esto tiene por consecuencia la destrucción de células neuronales, y con ello la producción de enfermedades neuro-inflamatorias, en donde se incluye la enfermedad de Alzheimer.

En la siguiente revisión bibliográfica se abordará en profundidad cual es la participación de las micropartículas plaquetarias en la enfermedad de Alzheimer, compendiando el conocimiento actual y los últimos avances acerca de esta temática.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar documentos científicos actualizados sobre el rol de las micropartículas plaquetarias en la enfermedad de Alzheimer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Actualizar el avance reciente acerca del mecanismo patológico de las micropartículas plaquetarias que conducen al daño neurodegenerativo.

Describir teorías de la relación existente entre micropartículas plaquetarias y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

4. MARCO TEORICO

En estos últimos años los estudios recientes han demostrado que las plaquetas secretan sustancias biológicamente activas como lo son las micropartículas, que no solo cumplen un rol en la hemostasia de los mamíferos, sino que también actúan en otros procesos como angiogénesis, inflamación y respuesta inmune, pudiendo influir directamente en diferentes patologías entre las cuales destaca la enfermedad de Alzheimer.

4.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por un deterioro cognitivo y de la memoria, neuropatológicamente se define como lesiones características; placas seniles maduras, ovillos neurofibrilares y la angiopatía amiloide cerebral (4)

4.1.1 Epidemiología

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia entre los países occidentales, representando el 60% de los casos. Afecta a unos 26 millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza por un patrón de crecimiento exponencial con la edad, doblándose cada cinco años aproximadamente, calculándose una prevalencia cuarenta veces

mayor para el año 2050 (5). Esto se reafirma en el Informe Mundial sobre el Alzheimer del año 2013, Alzheimer's Disease International en donde se estimó que en 2030 habrá 65,7 millones de enfermos y 135 millones en 2050 (6).

Se describe una prevalencia del 5,1% más frecuente en mujeres (5), esto debido a que entre los adultos mayores sobreviven más mujeres que hombres, aunque también podría influir la carencia de estrógenos en la mujer postmenopáusica (7).

Esta enfermedad conlleva un alto impacto a nivel social y económico. Según la estimación de Alzheimer's Disease International, en 2010 el gasto global ascendía a 604.000 millones de dólares, y en 2015 incrementaría en un 35% (5).

4.1.2 Fisiopatología

Existen diferentes hipótesis sobre la patogenia de EA, como la cascada amiloide, de la neurona colinérgica, la proteína Tau, sobre neuroinflamación, entre otras. Una de ellas indica que los pacientes con EA muestran pérdida de la actividad colinérgica en el sistema nervioso central, por lo que el cerebro presenta concentraciones bajas del neurotransmisor acetilcolina, principalmente en áreas asociadas con la memoria y el aprendizaje, afectando la transmisión sináptica y dando cabida a un proceso inflamatorio (8).

A pesar de lo anterior la hipótesis más aceptada es de la cascada amiloide (9) (Figura 1).. Ésta se remonta a 1992, cuando Hardy y Higgins plantearon por primera vez la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$) en el parénquima cerebral como el evento central en la patogénesis de la EA (10).

Algunos estudios han implicado al Ca^{+2} en la disfunción de la EA, explicando que alteraciones prolongadas en su hemostasia serían una causa inmediata de neurodegeneración. Se involucra también al péptido $A\beta$ el cual puede producir un desequilibrio del Ca^{+2} que resulta en la disminución progresiva de la memoria y el aumento de la apoptosis de células neuronales que inducen la EA (11)



Figura 1. Teoría centrada en el péptido β -amiloide en EA. Se presenta la hipótesis de la cascada amiloide representada como la teoría geocéntrica, en donde se grafican los principales participantes. Modificado de Ricciarelli R. Fedele E. 2017 (10).

La inflamación es uno de los efectos secundarios de los depósitos $A\beta$ causando activación de las células gliales y la expresión de mediadores inflamatorios. La inflamación se vuelve crónica, se generan especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y proteinasa, induciendo neurotoxicidad. La reacción inflamatoria puede estimular asimismo la regeneración $A\beta$ (12).

4.2 PROTEINA PRECURSORA AMILOIDE Y PEPTIDO β -AMILOIDE

La proteína precursora amiloide (APP) es una glicoproteína transmembranal que se deriva de un proteoglicano de mayor tamaño denominado PDMBP (Platelet-Derived Macrophage-Binding-Proteoglycan) secretado en grandes cantidades por las plaquetas y que inhibe la endocitosis de LDL-Ac (lipoproteínas de baja densidad acetiladas) en macrófagos (13).

El péptido β -amiloide es el producto de la ruptura de la proteína precursora amiloide (APP), que puede realizarse por la enzima de escisión de APP del sitio beta 1 (BACE1), la presenilina (PS1) y α -secretasa (ADAM10) con su sitio de escisión entre la β y la γ -secretasa (9) (Figura 2).

Se han descrito dos procesos de proteólisis del APP, uno amiloidogénico y otro no amiloidogénico. En este último la enzima α -secretasa corta la APP de manera que libera un fragmento extracelular soluble, el α -APPs. La parte que queda integrada en la membrana es procesada por una segunda enzima, γ - secretasa, que libera la parte carboxilo terminal de la proteína, dentro de vesículas lisosomales para su posterior degradación. Esta vía es conocida como vía no amiloidogénica, porque la acción de la α -secretasa previene la formación del péptido $A\beta$, con lo que se impide la formación de depósitos (14). Sin embargo, una parte de

la APP es procesada de manera diferente. Otra secretasa, β -secretasa, corta la APP liberando un fragmento carboxilo terminal más largo, que tras ser procesado por la γ -secretasa, libera el péptido $A\beta$. Este péptido tiene una solubilidad limitada y forma autoagregados que constituyen las fibrillas insolubles que se encuentran en las placas seniles. La acción de la β -secretasa y γ -secretasa produce diversos tipos de péptidos. La forma más común, relativamente soluble, tiene 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$), mientras que otras formas menores tienen una longitud de 42 o 43 residuos ($A\beta_{42-43}$). Éstas son mucho más insolubles que las primeras y forman fibrillas con características cinéticas mucho más rápidas (14).

Se ha comprobado la formación de placas seniles con depósitos extracelulares de $A\beta_{42}$ y ovillos neurofibrilares intraneuronales (NTFs) que contienen a la proteína TAU hiperfosforilada (12). De esta manera, la EA se caracteriza, por la presencia de nódulos intraneuronales y por la deposición de péptido $A\beta$ como placas seniles en el cerebro y en las paredes de los vasos sanguíneos produciendo la angiopatía amiloide cerebral (CAA). Lo que sugiere un fracaso en la eliminación de péptido $A\beta$ de los compartimentos extracelulares del cerebro, lo que se asocia con el deterioro cognitivo (15). Los factores de riesgo para CAA incluyen mutaciones del gen de la proteína precursora de amiloide (APP) y posesión del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE) (15). ApoE4 elimina lentamente los depósitos del péptido $A\beta$, en comparación a ApoE2 y ApoE3 que eliminan el péptido a una velocidad considerablemente más alta (16).

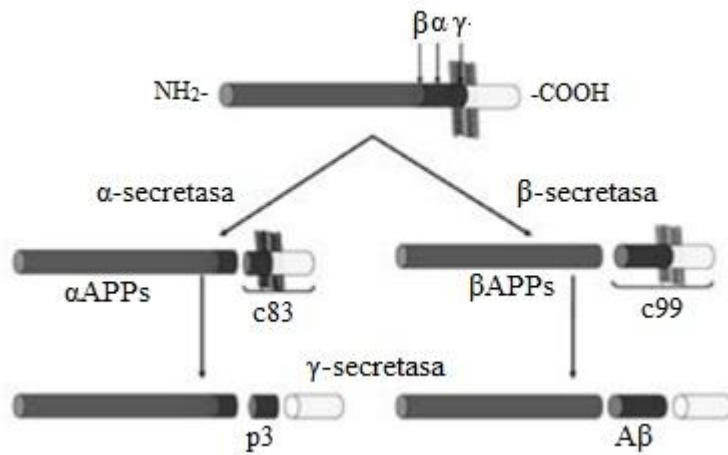


Figura 2. Cortes proteolíticos de APP. Se muestran los sitios de rotura por las secretasas β y γ . La acción secuencial de la secretasa β y la secretasa γ , originan el péptido β amiloide. Modificado de Gutierrez L. (2011) (17).

Bajo condiciones metabólicas normales aproximadamente 90% de la APP es procesada por la vía no amiloidogénica, generándose el fragmento α APPs debido a la acción de la α -secretasa en la membrana celular previniendo así la formación de $A\beta$. Alternativamente, en la vía amiloidogénica, el $A\beta$ es generado por el procesamiento secuencial de la β - y la γ -secretasa, las cuales producen las regiones N- y C-terminal respectivamente (17).

Hay varias isoformas de $A\beta$ que se diferencian por el número de residuos de aminoácidos en la región C-terminal del péptido. En un cerebro normal se producen principalmente dos isoformas $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, esta última es más propensa a formar agregados, considerándose una isoforma neurotóxica y es el mayor componente de las placas seniles (12). En condiciones fisiológicas se produce principalmente $A\beta_{40}$, mientras que los pacientes con EA tienen una elevada producción de $A\beta_{42}$, el cual produce efectos neurotóxicos (12), pudiendo desencadenar la activación de las células gliales neuronales y la liberación de citoquinas proinflamatorias (9). La inflamación se vuelve crónica, se generan especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y proteinasa, lo que causa la neurotoxicidad. Esto a su vez puede estimular la regeneración $A\beta$ generando una retroalimentación positiva (12). Sin embargo,

aunque una sobreproducción $A\beta$ tiene un efecto negativo sobre las células nerviosas, en bajas concentraciones pueden potenciar a largo plazo el hipocampo y mejorar la memoria

De esta manera, se presentan dos anomalías características: una abundancia de depósitos amiloides extracelulares, denominados placas seniles, y depósitos de proteína fibrilar en el interior de las neuronas, conocidos como ovillos neurofibrilares (18) (Figura 3).

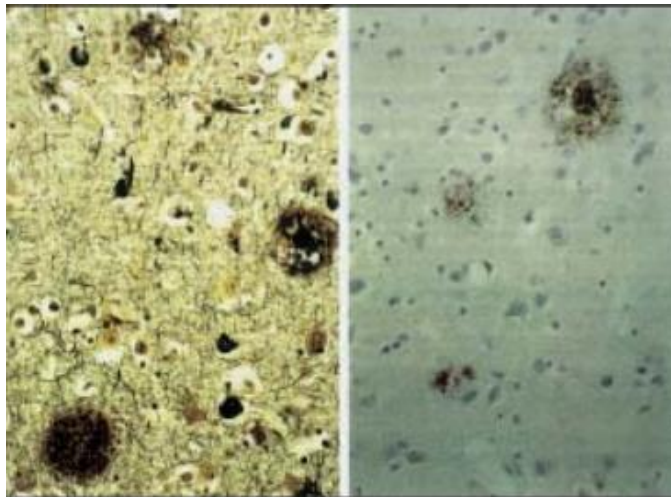


Figura 3. Ovillos neurofibrilares y placas seniles en la corteza cerebral. En A se observa con Tinción de Bielchowsky. En B inmunotinción con anticuerpo anti- $A\beta_{42}$. Extraído de Beteta E. (2004) (19)

Los ovillos neurofibrilares están constituidos por cúmulos de filamentos helicoidales emparejados, uno de sus constituyentes fundamentales es una forma anormalmente fosforilada de la proteína de los microtúbulos, llamada proteína Tau (14). Los ovillos de degeneración neurofibrilar suelen ser más abundantes en las áreas donde es más intensa la destrucción neuronal, es decir, el hipocampo y las zonas adyacentes del lóbulo temporal, que son estructuras que tienen una gran importancia en la función de la memoria (14).

Las placas seniles producen reacción inflamatoria alrededor de los depósitos de β -amiloide. Los terminales nerviosos en degeneración en las placas contienen también proteína tau. A medida que estos procesos celulares se desarrollan, las neuronas van muriendo en el hipocampo y la corteza (18).

Existe evidencia que sugiere que los péptidos $A\beta$ liberados son capaces de activar plaquetas, promover su adhesión y agregación (20). El primer evento en la activación plaquetaria inducida por el péptido $A\beta$, es el aumento de la concentración intracelular de Ca^{+2} ya que este péptido es capaz de formar poros permeables a los cationes en las membranas plasmáticas, lo que concuerda con la evidencia de que la toxicidad $A\beta$ deriva de la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} (20).

El péptido $A\beta$ regula la exposición a fosfatidilserina, la producción de micropartículas y la activación de caspasas, lo que sugiere una transición de plaquetas desde la activación a la apoptosis (21).

Diferentes vías de señalización intracelular están implicadas en la activación plaquetaria e involucran moléculas esenciales para modular el procesamiento de APP (22). Dentro de esas moléculas, destaca la calpaína, a la cual se le atribuye la función de producir péptido $A\beta$ a través del procesamiento de la APP, durante la activación plaquetaria (13).

4.3 CALPAÍNA EN LA FORMACIÓN DEL PÉPTIDO A β 40

Las calpaínas corresponden a proteasas de cisteína reguladas por calcio presentes en la mayoría de los tejidos. Desempeñan funciones funcionalmente importantes en diversos procesos biológicos, como la reorganización del citoesqueleto, la motilidad celular, la proliferación celular, la apoptosis y la hemostasia. Se han identificado al menos 14 calpaínas, pero solo dos son de mayor importancia: la calpaína μ , o calpaína I, que es completamente activa en concentraciones micromolares de calcio, y la calpaína m , o calpaína II, que funciona a concentraciones de calcio milimolar (23). Se expresan altamente en todo el CNS. Si bien ambas proteasas están presentes en las neuronas y en las células gliales, su abundancia relativa difiere. La calpaína 1 es más abundante en las neuronas, y la calpaína 2 es prominente en las células gliales (24).

La activación anormal de la calpaína es responsable de la degradación de proteínas celulares, como proteínas de señalización, factores de transcripción y sustratos citoesqueléticos (25).

Se ha encontrado en el tejido cerebral de pacientes con EA niveles de Ca^{+2} y de m -calpaína elevados, además de una autólisis incrementada de la μ -calpaína, por lo que es probable que la pérdida de la homeostasis de Ca^{+2} interrumpa los procesos fisiológicos que regulan la actividad de la calpaína (26).

Calpaína I es la forma más concentrada en las sinapsis, y se activa anormalmente en el cerebro con EA. Mientras que la calpastatina, el inhibidor endógeno de las calpaínas

disminuye significativamente en el mismo trastorno neurodegenerativo (25). La forma activada de calpaína 2 aumenta en las neuritas de las neuronas con riesgo de desarrollar patología neurofibrilar, y se encuentra ampliamente unida a estos ovillos en los cerebros de pacientes con EA. Sumado a la sobreactivación de la calpaína provocada por niveles anormalmente altos de calcio y el agotamiento de la calpastatina conducen a una escisión o degradación de proteínas neuronales clave en la EA (25).

La proteína reguladora p35, que interviene en el desarrollo de tejido nervioso, es fragmentada por las calpaínas en tejidos de pacientes enfermos, hasta 25kD (p25). Ésta es responsable de la hiperfosforilación de la proteína tau, la cual se encuentra asociada a los microtúbulos de las neuronas (26). La hiperfosforilación hace a la proteína tau altamente resistente a la degradación por la μ -calpaína, además de llevar a la formación de filamentos helicoidales emparejados que son aglomerados de la proteína tau hiperfosforilada, éstos al depositarse son llamados ovillos neurofibrilares. Y dado que las proteínas de los neurofilamentos son sustratos excelentes para las calpaínas, estas contribuyen importantemente a la necrosis neuronal que acompaña a la enfermedad de Alzheimer (26) (Figura 4).

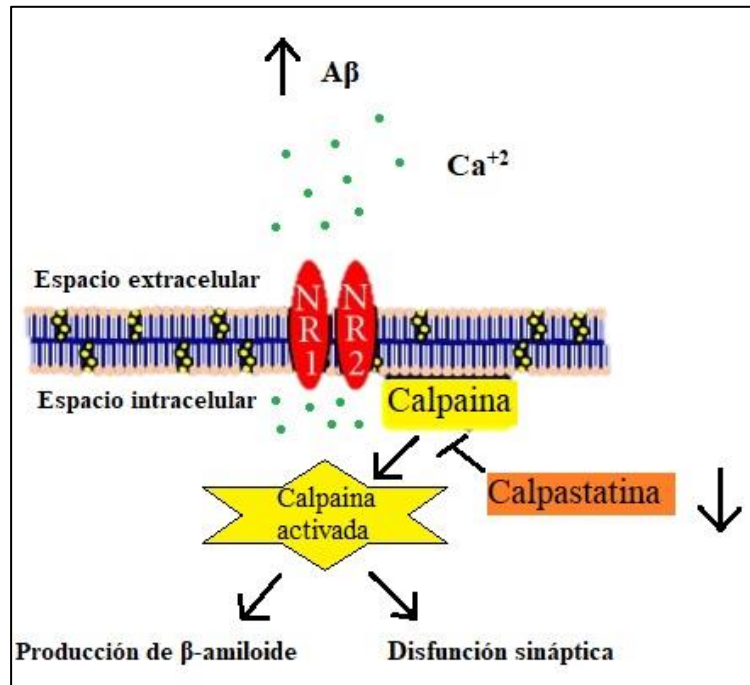


Figura 4 Calpaína en el contexto de la EA. El aumento de los niveles de A β induce la entrada de calcio (Ca²⁺) a través de los receptores glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NR1 y NR2) en las neuronas. A este influjo se suma la disminución de los niveles de calpastatina produciéndose la desregulación de la actividad de la calpaína, lo que conduce a la escisión de proteínas involucradas en la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, así como a la disfunción sináptica. Extraído y modificado de Ferreira A. (2012) (24).

También se postula que las calpaínas modulan el tráfico de la proteína precursora de amiloide (APP) e indirectamente su procesamiento proteolítico. Además, las calpaínas influyen en la fosforilación y la proteólisis de tau, que es otra proteína asociada con la EA. Otros sustratos de calpaína afectados en la EA incluyen CaM-quinasa II α (CaMK-II α) y PKC, las que corresponden a enzimas que regulan la fosforilación de la APP e influyen en su metabolismo (25).

La mayoría de la actividad de la β -secretasa se origina a partir de una proteasa codificada por el gen de la enzima 1 que separa la APP del sitio β (BACE1). Esta es una proteína que presenta homología con la familia de las pepsinas, proteasas de aspartato. BACE-1 tiene altos

niveles de expresión en neuronas y parece ser la principal enzima de la vía amiloidogénica (17). Se postula que la actividad de BACE1 aumenta significativamente en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EA. De acuerdo con los hallazgos experimentales en un modelo animal con EA, la expresión de BACE1 se promueve mediante la activación de calpaína (27). También se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la calpaína mejora la memoria, la transmisión sináptica y reduce la patología en un modelo de ratón con EA (27).

Como ya se ha mencionado, las calpaínas participan en la activación celular y/o la apoptosis lo que conduce a la formación de micropartículas (MP). Además, se sabe que las MP derivados de plaquetas, que representan la mayoría de los MP en circulación, llevan calpaína activa. Por lo tanto, la actividad de la calpaína en el plasma y los niveles de MP plaquetarias parecen estar directamente asociados.

Lo anterior quedó demostrado en un estudio del 2015, en donde la actividad de la calpaína aumentó significativamente en el LCR de los pacientes con EA en comparación con los controles sanos. Curiosamente, solo se detectó m-calpaína pero no μ -calpaína. También se evidenció que los pacientes con EA mostraron niveles significativamente mayores de MP en el LCR en comparación con los controles. Se definió una correlación positiva entre la actividad de la calpaína y los niveles de MP en el 93,33% de los individuos. Además, la actividad de la calpaína en el LCR se correlacionó significativamente de manera inversa con los niveles de $A\beta_{42}$ (27).

Por lo tanto, las plaquetas son elementos claves que relacionan la deposición del péptido $A\beta$, inflamación periférica y la senescencia endotelial. Lo más importante es que las

plaquetas almacenan y procesan la APP, que se escinde en los péptidos A β tóxicos y acumula A β en el cerebro y los vasos en EA (28).

4.4 GENERALIDADES DE PLAQUETAS

Las plaquetas son el segundo componente sanguíneo más prevalente después de los eritrocitos. Luego de ser liberadas por su precursor megacariocito (20 mm de diámetro), las plaquetas ingresan en el torrente sanguíneo y circulan durante 7 a 10 días (29) en concentraciones de 150,000-450,000 células/ μ l. De la cantidad total de plaquetas en el cuerpo, 70% se mantiene en circulación, mientras que el restante 30% permanece de manera transitoria pero constante en el bazo (30)

De esta manera, las plaquetas corresponden a fragmentos citoplasmáticos anucleados que circulan en la sangre en forma de disco biconvexo de aproximadamente 2 a 5 μ m, y poseen carga eléctrica negativa en su superficie (31).

A pesar de que las plaquetas no poseen ADN genómico, si presentan ARN mensajero y la maquinaria necesaria para la síntesis de las proteínas (30). Además, poseen una conformación compleja con 3 tipos distintos de gránulos: gránulos α , gránulos densos y lisosomas (29). Los gránulos α constituyen un 15% del volumen total de la plaqueta, son organelos esféricos ricos en macromoléculas con una porción de alta densidad de electrones. Sus membranas contienen GPIIb/IIIa, escasa cantidad de GPIb, GPIX y P-selectina. También poseen proteínas adhesivas como fibrinógeno, fibrinectina, factor von Willebrand (FvW), trombospondina y vitronectina, sustancias que fomentan el crecimiento, como factor de

crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor plaquetario 4 y factor transformador de crecimiento. Además de factores de la coagulación, entre ellos factor V, cininógeno de alto peso molecular, factor XI y activador plasminógeno inhibidor-1 (30). Su importancia radica en propiciar la interacción entre plaquetas, por lo que la cantidad de gránulos α determina el valor funcional de la célula (31). También participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido.

Por otro lado, los gránulos densos se caracterizan por su alta densidad electrónica, contienen moléculas pequeñas ADP, serotonina, fosforo inorgánico y un elevado contenido de calcio que representa el 50% de su contenido (31). Los lisosomas plaquetarios contienen enzimas como glicohidrolasas y enzimas que degradan las GP (glicoproteínas), glicolípidos y glicosaminoglicanos (29) (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de la membrana externa y de los gránulos plaquetarios.

| Integrina | Ligando | Granulos alfa | Gránulos densos |
|------------------|----------------|------------------------------|------------------------|
| GPIIb/IIIa | Fibrinógeno | Factor plaquetario 4 (PF4) | ATP |
| | FvW | b tromboglobulina (bTG) | ADP |
| | Vitronectina | Factor de crecimiento (PDGF) | Calcio |
| | Trombospondín | Fibrinogeno | Magnesio |
| | | | 5 HT (serotonina) |
| GPIbIX | FvW | FvW | Epinefrina |
| GPIaIIa | Colágeno | Trombospondín | Norepinefrina |
| GPIV | Trombospondín | Fibronectina | Dopamina |
| GPVI | Colágeno | P selectina | |
| GPIcIIa | Fibronectina | Colagenasa | |
| | | Elastasa | |
| | | Inhibidores de proteasas | |

Extraído de García Milagros y Coma Cristina (2000) (31).

4.4.1 Activación plaquetaria

En condiciones habituales las plaquetas circulan de manera no activa en forma discoide (32). Sin embargo, la activación plaquetaria, se asocia con un cambio de forma, y la desgranulación de los gránulos densos y α , redistribuyendo varias proteínas de los gránulos a su superficie facilitando su interacción con otras células (33). Dentro de los agonistas de la activación, se incluyen el ADP, el TxA₂, la epinefrina y la trombina principalmente (32).

Al ocurrir algún tipo de injuria que genere una alteración en la integridad del endotelio, se exponen moléculas como colágeno, FvW y otras proteínas de la matriz subendotelial (32). Éstas permitirán la adherencia plaquetaria y estimularán su activación, generando la unión de la GPIb al FvW, que se adhiere al colágeno subendotelial, o la interacción de la GP Ia/IIa que puede unirse de manera directa al colágeno (34). De esta manera se reclutan de nuevas plaquetas, en un proceso conocido como agregación plaquetaria, lo que finalmente llevará a la activación de los receptores α IIb β 3, que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, permitiendo el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas, en donde también actúa el ligando de CD40 (CD40L) (32). Al ocurrir la unión de los receptores plaquetarios con sus ligandos se desencadenan cascadas bioquímicas de señalización intracelular mediante segundos mensajeros, como el calcio, la fosfolipasa C, el fosfoinositol-3-quinasa y el AMP cíclico, los cuales inducen el cambio de forma de la plaqueta, la liberación de gránulos, y de ácido araquidónico que participa en la vasoconstricción local (35).

Durante la activación de las plaquetas, la fosfatidilserina (PS) se mueve desde el interior hacia el exterior de la bicapa de la membrana, lo cual es responsable de la actividad procoagulante de las plaquetas, proporcionando sitios de unión para el ensamblaje de la

protrombinasa y el complejo tenasa (36). Esto se acompaña de la liberación de microvesículas ricas en fosfatidilserina que son procoagulantes y representan la actividad promotora de coágulos del suero. También se ha demostrado que las microvesículas derivadas de plaquetas estimulan las células hematopoyéticas y transfieren receptores específicos de plaquetas a la superficie de otras células (36).

Se ha informado un grado elevado de activación plaquetaria en pacientes con AD mediante la cuantificación de la expresión en superficie de CD62P (P-selectina), agregados plaquetarios y complejos de leucocitos plaquetarios (33).

Por lo tanto, producto de la activación, las plaquetas liberan micropartículas que pueden mediar respuestas inflamatorias y contribuir a exacerbar enfermedades y afecciones inflamatorias (37) dado su importante papel en la señalización celular. De esta manera, los estudios que involucran plaquetas y MP plaquetarias pueden ser una herramienta para la comprensión de los mecanismos metabólicos periféricos relacionados con la EA que ocurre en el SNC (38).

4.5 MICROPARTÍCULAS

Las micropartículas (MP) se definen como pequeñas vesículas de membrana que se liberan de diferentes tipos de células por la brotación exocítica de la membrana plasmática en respuesta a la activación celular o apoptosis (39). En algunos estudios se refieren a ellas como micropartículas (MP), microvesículas o exosomas. Mientras que otros, utilizan el término microvesículas para describir tanto a las MP como a los exosomas, que es otro tipo

de vesícula secretada (40). Incluso en la literatura biomédica, el término "micropartícula" se usa a veces para describir las partículas de biopolímero utilizadas en la administración de fármacos (40). En 2014, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares realizaron una publicación que detalla sus recomendaciones sobre los "requisitos experimentales mínimos para la definición de vesículas extracelulares y sus funciones" (41).

De esta manera, las MP deben distinguirse de otras vesículas liberadas por células, los exosomas y los cuerpos apoptóticos (Figura 5), pues se diferencian bioquímica y morfológicamente.

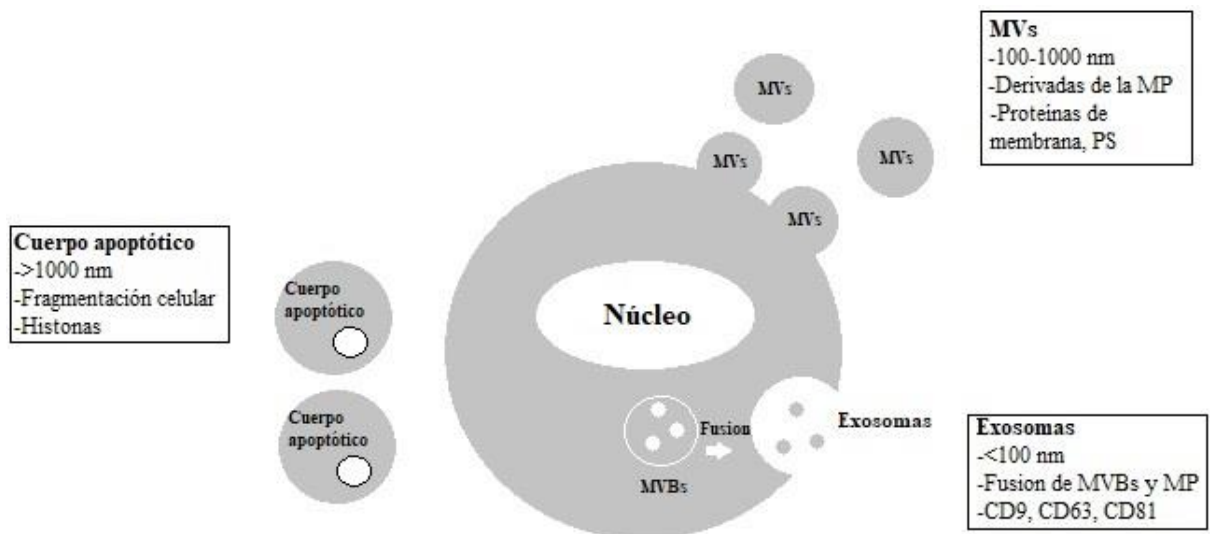


Figura 5. Mecanismos de vesiculación celular. Se representan tres tipos diferentes de vesículas extracelulares con dimensión, origen y marcadores. Abreviatura: (MVs) microvesículas, (MP) membrana plasmática, (PS) fosfatidilserina, (MVBs) cuerpos multivesiculares. Modificado de Porro C. Trotta T. y Panaro M. (2015) (42).

Los exosomas son vesículas preformadas, de un tamaño <100 nm que se generan en vesículas endocíticas, y son liberados por exocitosis. Son más homogéneas en tamaño que

las MP, y juega un papel importante en la respuesta inmune. Por otro lado los cuerpos apoptóticos son liberados al final de la muerte celular programada, mientras que las MP se liberan durante las primeras etapas (Figura 6), además son típicamente más grandes que las MP (1–3 μm), aunque algunos pueden ser más pequeños (0.5 μm) (43), contienen material nuclear, orgánulos celulares y fragmentos de membrana citosólica (Tabla 2) (40). Pero al igual que las MP, los cuerpos apoptóticos exteriorizan la fosfatidilserina (PS) por lo tanto, se deben considerar los factores mencionados y otros para diferenciar estos dos tipos de vesículas, principalmente los marcadores proteicos respectivos (40).

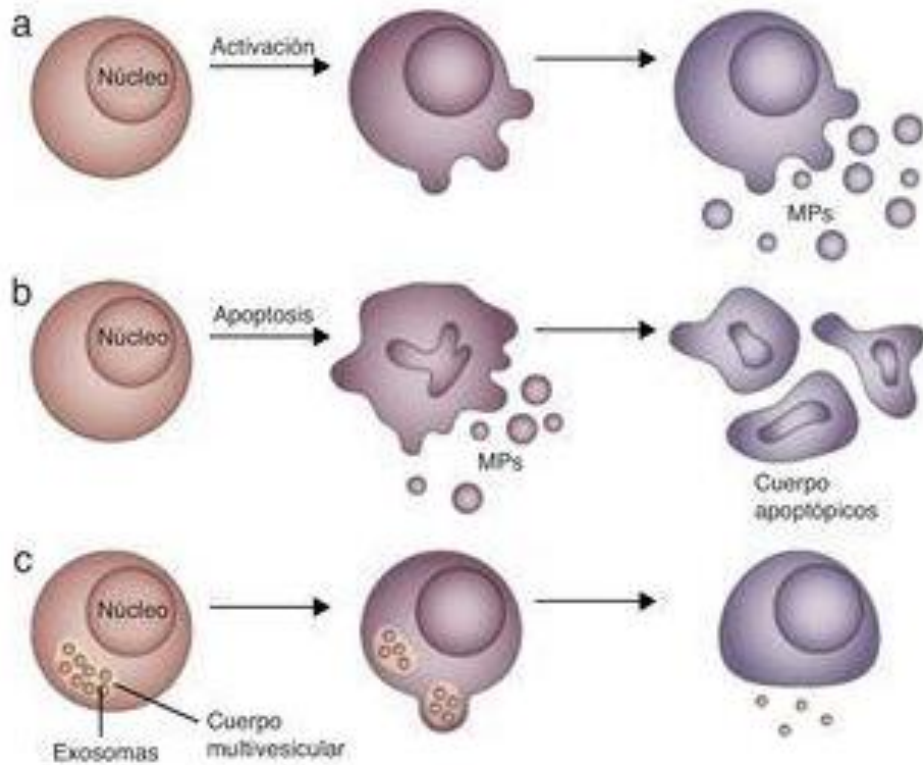


Figura 6 Formación de MP, cuerpos apoptóticos y exosomas. Representación gráfica de la formación de vesículas extracelular, los cuerpos apoptóticos (b) a diferencia de las MP (a), se producen durante las fases tardías de la apoptosis, y generalmente son fagocitados sin generar inflamación, mientras que los exosomas (c) se forman intracelularmente por vesiculación interna de compartimentos endosómicos, se almacenan en cuerpos multivesiculares y se secretan por exocitosis. Extraído de Muñoz C. Vasquez G. (2012) (44).

Tabla 2. Propiedades físicas de las vesículas derivadas de membrana.

| | Exosomas | Micropartículas | Cuerpos apoptóticos |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Tamaño | 40-100 nm | 100-1000 nm | >1000 nm |
| Apariencia | Homogéneo | Heterogéneo | Heterogéneo |
| Sedimentación | 100,000 g | 10,000 g | 1,200 g |
| Sitio de origen | Cuerpos multivesiculares (MVBs) | Membrana de plasma | Células en apoptosis |
| Composición lipídica | Colesterol, ceramida | Fosfatidilserina, colesterol | Fosfatidilserina |
| Principales marcadores proteicos | Tetraspaninas, proteínas GPI | Integrinas, selectinas, ligando CD40 | Histonas |

Extraído de Schindler S. Little J y Klegeris A. (2014) (40).

Las MP han cobrado relevancia ya que no solo se derivan de las plaquetas, aunque la mayoría de las MP que se encuentran en circulación sanguínea se originan a partir de ellas, también se liberan de los leucocitos, eritrocitos, células endoteliales, células musculares lisas y células cancerosas (39). Se presentan en concentraciones relativas según el contexto fisiopatológico.

La actividad procoagulante de las MP es su propiedad más característica como determinante de la trombosis en diversas enfermedades vasculares y sistémicas, incluyendo infarto de miocardio y diabetes (45). También se ha asociado un aumento de las MP circulantes en accidentes cerebrovasculares isquémicos, esclerosis múltiple, y malaria cerebral. Datos recientes indican que además de sus componentes procoagulantes y antígenos de identidad, las MP transportan una serie de efectores bioactivos que se puede diseminar, intercambiar y transferir (45). Las MP que contienen tanto PS como el factor tisular de la proteína procoagulante (TF) tienen un nivel más alto de actividad procoagulante. TF es el principal activador celular de la cascada de coagulación (46).

En la literatura se presenta que las MP actúan en distintas alteraciones e incluso en algunas enfermedades, pero, su rol más ampliamente aceptado es la capacidad de promover y apoyar el proceso de coagulación de la sangre. En consecuencia, hay un interés continuo en estudiar MP en trastornos de hemostasia y trombosis (43), pero a la vez se han encontrado niveles elevados de MP en varias afecciones asociadas con inflamación, activación, disfunción celular, angiogénesis y transporte (39).

La mayoría de las MP son de origen plaquetaria (PMP) (39), representando entre el 70-90% de las MP presentes en circulación sanguínea (46), y son el tema central de esta revisión. Corresponden a vesículas lipídicas derivadas del retículo endoplásmico y membrana plasmática, y son liberadas por plaquetas activadas (40). Sus principales marcadores proteicos son la integrina α IIb β 3, P-selectina y el ligando CD40 (40, 47). Las PMP tienen una correlación positiva significativa con la activación plaquetaria, promueven la salida de sustancias inflamatorias, incluidas las moléculas de adhesión (α 5 integrinas), mediadores inflamatorios (IL-1 β , IL-7 e IL-11), y quimioquinas CC por unión a monocitos y otras células (48, 49). Por lo tanto, PMP puede ser utilizado como un indicador de activación plaquetaria. Sin embargo, a pesar de que su activación es de carácter fisiológico, también se pueden ver estimuladas ante la presencia de distintas patologías, como en la enfermedad neuro-inflamatoria Alzheimer (38).

4.5.1 Formación de micropartículas

Aunque las células en reposo muestran una liberación constitutiva de MP, la activación y la apoptosis parecen ser los principales desencadenantes para la generación de mayores cantidades de MP (40). Además, ciertos tipos de estrés como la hipoxia o la irradiación, la lesión oxidativa y las fuerzas de cizalla pueden aumentar el número de MP liberados. A parte

de los factores estresantes celulares, se han identificado estímulos específicos que desencadenan la formación de MP de diferentes tipos de células. Las plaquetas, por ejemplo, se pueden inducir a liberar estas microvesículas mediante la exposición a lipopolisacáridos (LPS), Shiga toxina, trombina, colágeno, interleucina (IL)-6, eritropoyetina, entre otros (40).

Las micropartículas son el resultado de la formación de burbujas en la membrana plasmática luego de la activación celular. Esta activación induce la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, lo que lleva a la externalización de fosfatidilserina (PS). Brevemente, el aumento del Ca^{2+} , asociado a la activación de una quinasa regulada por señal extracelular, induce un estado de desorden en la asimetría de la membrana de fosfolípidos de las células quiescentes, lo que sumado a la interrupción del citoesqueleto termina en la formación de MP (50).

La externalización de PS es otro aspecto clave de la formación de MP. Las dos capas de la membrana plasmática tienen composiciones distintas. Los aminofosfolípidos, que incluyen PS y fosfatidiletanolamina, se encuentran principalmente en el lado interno de la membrana celular, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomiélin se encuentran la parte externa. La distribución asimétrica de los lípidos se mantiene mediante tres grupos de enzimas con funciones muy específicas: flipasas, floppasas y scramblases. La mayoría de los estudios informan que la exposición a la superficie de la PS es un signo temprano de activación celular o apoptosis, que precede a la liberación de MP (40).

En el territorio vascular, el PS expuesto sirve de modelo catalítico o superficie funcional para el anclaje de complejos de factores de la coagulación, promoviendo así in situ la hemostasia, una función fisiológica de las plaquetas activadas, y la secreción de MP

plaquetarias. Como sensores de la estimulación procoagulante, las plaquetas son los principales contribuyentes de los niveles circulantes de MP (45).

La activación plaquetaria puede deberse por daño de células endoteliales y anomalías en la membrana plaquetaria. Una característica de las enfermedades inflamatorias e infecciosa es la activación de células sanguíneas y del sistema vascular. Esta activación conduce a un proceso de vesiculación que forma las micropartículas que corresponden (Figura 7), como ya se ha mencionado, a fragmentos de membrana plasmáticas de algunas células, formadas en condiciones fisiológicas o cuando se altera la homeostasis del tejido. Las micropartículas forman un grupo heterogéneo, pero en general se definen por su tamaño menor a 1 micrómetro y por la presencia de PS en su superficie exterior. Las MP poseen características de acuerdo con las células que se originan a partir de ellas, es decir, se mueven portando proteínas de membrana de sus células de origen. Las más comunes se derivan de las plaquetas (38). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que incluso las MP que se originan en un solo tipo de célula no siempre son exactamente iguales (40).

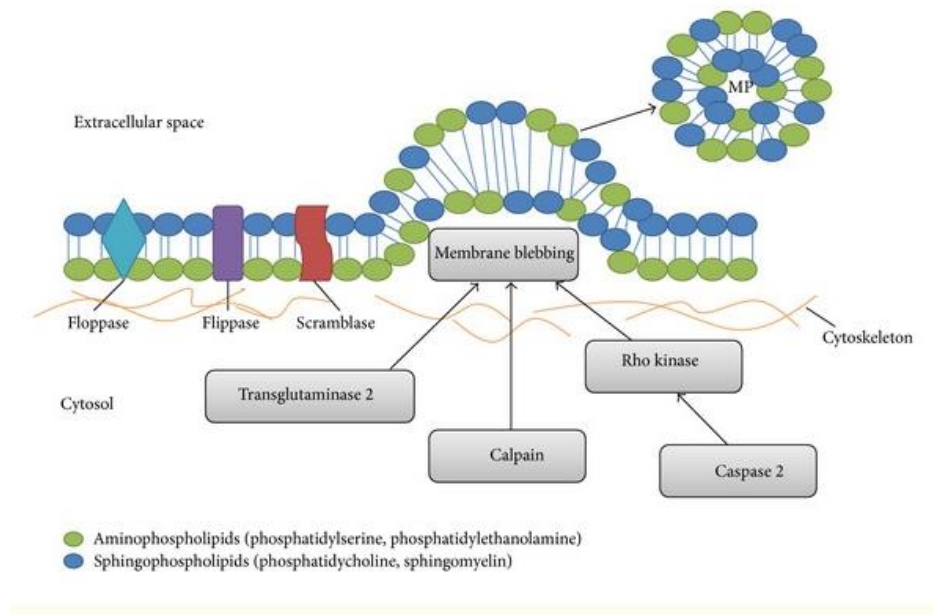


Figura 7. Posible mecanismo de desprendimiento de micropartículas. Al activarse las células se lleva a cabo la formación de MP, de esta manera se pierde la asimetría de los lípidos y se produce un reordenamiento del citoesqueleto. Extraído de Schindler S. Little J y Klegeris A. (2014) (40).

4.5.2 Actividad procoagulante de las micropartículas

El conocimiento actual sugiere que los factores de coagulación VII y IX, una vez unidos a la membrana PS en presencia de calcio, son activados por TF (factor tisular) transmitida por MP, iniciando así la cascada de coagulación que conduce a la generación de trombina y, en definitiva, a la formación de un coágulo de fibrina-plaqueta (45).

Como ya se ha mencionado, la presencia de PS aumenta significativamente la actividad procoagulante de las MP, esto debido a que facilita el ensamblaje de los componentes de la cascada de coagulación (46). De esta manera, se genera una interacción electrostática entre los dominios de ácido γ -carboxiglutámico (GLA) de las proteínas de la coagulación como la protrombina, los factores VII, IX y X, con el PS en la membrana (46).

También destaca la participación del TF, éste es un receptor para el factor VII activado (FVIIa). El complejo TF/FVIIa activa al FX y IX para iniciar el proceso de coagulación. Esto explica porque la presencia de FT en las MP aumenta drásticamente su actividad procoagulante (46).

Se ha asociado un aumento en la actividad de TF con un aumento en la PS (P-selectina), por lo que se ha propuesto que la PS podría inducir un cambio conformacional en la TF, lo que aumentaría su actividad específica. También se ha planteado que las MP contienen TF en un estado de actividad baja para evitar la activación de la cascada de coagulación. Por analogía con las células, esto podría deberse al hecho de que los niveles de PS en los MP están por debajo del nivel óptimo para la actividad completa de TF (45).

Al llevar componentes del citoplasma de las plaquetas, las MP plaquetarias pueden ejercer sus efectos sobre las células receptoras transfiriendo su contenido, como mediadores lipídicos bioactivos, citoquinas, ARNm y microARN. Desempeñando un papel importante en la expresión génica en todo el sistema circulatorio

4.5.3 MicroARN asociados a micropartículas plaquetarias

Las plaquetas dependen de un rico repertorio de ARN mensajeros (ARNm), microARN, otros ARN y proteínas no codificantes para modular sus funciones primarias, como la adhesión, agregación y secreción. Los microARN son especies de ARN endógenas y no codificantes de 19–24 nucleótidos de longitud que desempeñan un papel crucial en la regulación de la traducción del ARNm en proteínas (37). Las plaquetas albergan una variedad extremadamente amplia y diversa de microRNAs, lo que se contradice con su nivel relativamente bajo de síntesis de proteínas (51).

Se encuentran cantidades significativas de microARN extracelulares en exosomas, desprendimiento de vesículas, cuerpos apoptóticos y micropartículas (52).

Las MP plaquetarios pueden mediar efectos fisiopatológicos, participar en hemostasia, trombosis, inflamación, transferencia de infección maligna, angiogénesis e inmunidad al actuar como portadores intercelulares que suministran, proteínas bioactivas como citoquinas, ARNm, y también microRNAs a las células receptoras (37).

Sumado a lo anterior, las MP plaquetarias median la transferencia de microARN a otras células del sistema circulatorio y regulan la expresión y función de los genes de las células receptoras. Las plaquetas activadas liberan MP que contienen microRNAs, así como mediadores de lípidos bioactivos, citoquinas, mRNA y una amplia variedad de RNA adicionales no codificantes (37). Las plaquetas humanas pueden transferir eficazmente su contenido de microARN a células endoteliales humanas (Figura 8) y macrófagos a través del lanzamiento de los MP. De esta manera se puede decir que las MP plaquetarias pueden proteger a los microARN de las nucleasas extracelulares y actuar como portadores intercelulares de microARN funcionales, a través de la cual pueden ejercer una regulación de la expresión génica endógena y modular la función de las células receptoras en el sistema circulatorio (37).

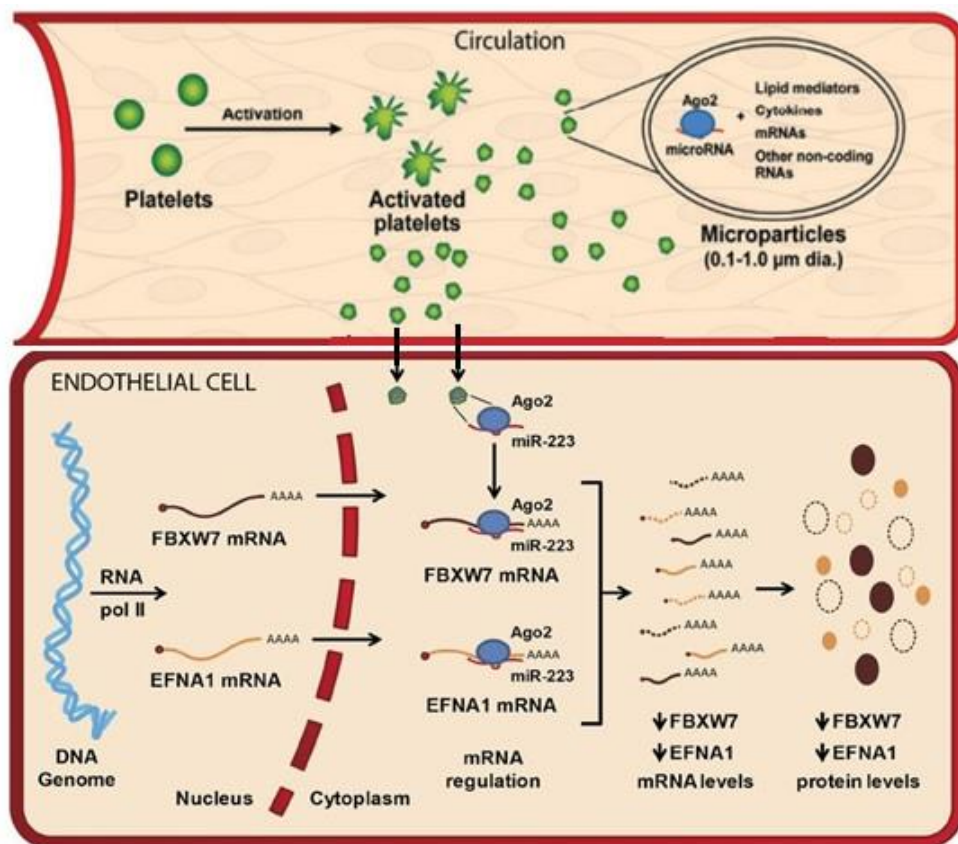


Figura 8. Modelo propuesto para la transferencia intercelular de microARN a otra célula del sistema circulatorio. Las plaquetas activadas liberan MP que contienen microRNAs, mediadores de lípidos bioactivos, citoquinas, mRNAs. Las plaquetas pueden transferir eficazmente su contenido de microARN, como complejos Ago2 · microARN, a células endoteliales. Extraído de Laffont B. (2013) (53).

Considerando las propiedades proinflamatorias de las MP plaquetarias, es muy probable que éstas y su carga de microARN puedan estar implicados en afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos agudas y crónicas, como las relacionadas con enfermedades del sistema nervioso central, cardiovasculares, con la aterosclerosis, la transfusión de plaquetas y el cáncer (37).

4.5.4 Micropartículas en el SNC

Durante los últimos años, los estudios han revelado las vesículas de membrana extracelular como nuevas estructuras especializadas para la comunicación intercelular. Cada vez es más evidente que las micropartículas pueden contribuir a la aparición y progresión de algunas enfermedades neuroinflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, cáncer y patologías del SNC. De esta manera, se ha observado un aumento en las MP plaquetarias en pacientes con mayor activación plaquetaria, como los pacientes con enfermedad de Alzheimer (38).

El consenso entre los estudios recientes es que los niveles elevados de tipos específicos de MP en plasma y LCR pueden representar marcadores biológicos útiles en biomédica, investigación y medicina clínica, siendo confiables para determinar el inicio y la progresión de las enfermedades del SNC (40) (Tabla 3).

Tabla 3. Micropartículas derivadas de diferentes células en enfermedades del SNC.

| Patología | | Patrón de MP | Técnica utilizada |
|----------------------------------|--------------|---|--------------------------|
| Ataque cerebral | Sangre | MP plaquetarias elevadas | Citometría de flujo |
| Accidente cerebrovascular | Sangre | MP plaquetarias elevadas | Citometría de flujo |
| Malaria cerebral | Sangre | MP endoteliales elevadas | Citometría de flujo |
| Esclerosis múltiple | Plasma | MP endoteliales elevadas | Citometría de flujo |
| Esclerosis múltiple | LCR | Presencia de MP derivadas de oligodendrocitos | Microscopia electrónica |
| Traumatismo cerebral | Plasma y LCR | Presencia de MP endoteliales | Ensayo de protrombinasa |
| Glioblastoma | LCR | Presencia de MP endoteliales | Inmunoblot |

Modificado de Schindler S. Little J y Klegeris A. (2014) (40).

4.6 MICROPARTÍCULAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los estudios han demostrado que las plaquetas pueden usarse para el análisis de las vías metabólicas relacionadas con la patogénesis periférica de la EA, particularmente con la cascada amiloide y la regulación del estrés oxidativo. Las plaquetas son la fuente más importante de formas circulantes de APP y otros componentes fisiopatológicos importantes de la EA, como la proteína asociada a microtúbulos Tau y la glucógeno sintasa quinasa-3B (GSK3B). Además de contener enzimas que dividen la APP, que son biológicamente activas y responden a estímulos sistémicos (54).

Las MP plaquetarias juegan un rol potencial en la patogénesis de la EA. El péptido β -amiloide es el mayor constituyente de los depósitos fibrilares en las placas seniles y vasos sanguíneos de pacientes con EA (55). Las placas son causadas por una acumulación anormal de $A\beta$, que se libera a partir de una proteína precursora amiloide (APP) tras un proceso de

proteólisis (40) (Figura 9). Las plaquetas son una importante fuente vascular de APP conteniendo más del 95% circulante de esta proteína, además de A β soluble (sA β) (55). Una vez ocurrida la activación plaquetaria, el péptido A β es liberado y transportado dentro de las micropartículas, e incluso se ha descrito que las MP plaquetarias son capaces de unirse y transportar APP (42). Además, existe cada vez más evidencia que estas microvesículas pueden participar en la transferencia de A β entre células (40). En simples palabras, en EA las MP se unen y transportan APP y A β , además de representar el sitio de clivaje de APP.

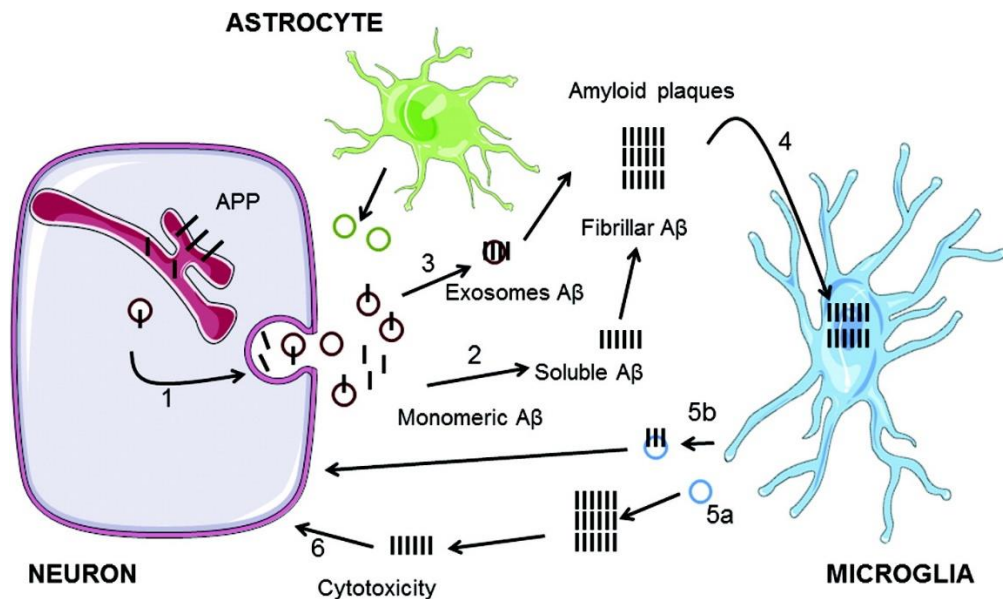


Figura 9. Representación de los efectos de micropartículas en el ensamblaje de A β extracelular. 1. A β se deriva del procesamiento proteolítico de APP y se transporta en MP. 2. Una vez liberados, los agregados de A β monoméricos forman los oligómeros de A β solubles tóxicos y luego A β fibrilar. 3. Captación de A β monomérico por neuronas o astrocitos y generación en su superficie de A β fibrilar. 4. Los A β fibrilares y solubles son internalizados y degradados por microglía. 5. Las MP liberadas por microglía promueven la formación de A β soluble a partir de agregados insolubles (5a) y también contienen formas tóxicas generadas a partir de A β internalizado 5b. 6. La forma A β soluble y los MV almacenados en A β son tóxicos para las neuronas. Extraído de Mallocci M. (2019) (50).

Como ya se ha mencionado, las plaquetas cumplen papel crucial en procesos inflamatorios, debido a que secretan una gran variedad de mediadores inflamatorios. Por lo tanto, la activación plaquetaria incontrolada en pacientes con EA puede llevar a un estado crónico de inflamación, causando estrés endotelial y desprendimiento de micropartículas,

junto con la liberación de A β , lo que podría contribuir a aumentar los depósitos de amiloide (55).

En una de las primeras publicaciones en las que se estudió la relación de las plaquetas en la EA. Se examinaron mediante microscopía electrónica plaquetas provenientes de pacientes con EA y se comparó con pacientes neurológicamente sanos (56). De esta manera, se informó la presencia células atípicas con un sistema interno inusualmente abundante de membranas lisas tres veces mayor en las muestras de pacientes con demencia. Además, las membranas plaquetarias del grupo con EA mostraron un aumento significativo en su fluidez lo que se correlaciono con la frecuencia de plaquetas atípicas visualizadas. Y dado que las membranas plaquetarias internas son más fluidas que las externas, sugirieron que el aumento en la fluidez de la membrana plaquetaria asociada con la EA puede ser el resultado de una desregulación en la biosíntesis de la membrana. (56).

En el año 98 se realizó un estudio utilizando citometría de flujo para medir la activación de las plaquetas en 91 pacientes con EA y 40 sujetos control sanos. Se comparó el porcentaje de agregados plaquetarios circulantes, la formación de complejos de plaquetas-leucocitos y la presencia de micropartículas plaquetarias circulantes. Los resultados obtenidos revelaron un aumento del 39,5% en el porcentaje de agregados plaquetarios, un aumento del 53,3% en complejos de leucocitos-plaquetas en el grupo con EA, pero no se encontraron mayores diferencias en el número de micropartículas plaquetarias ni en el recuento total de plaquetas. De esta manera se concluyó que la EA no pareció alterar la formación de PMP (57). Esto es consistente con un hallazgo similar reportado por Lee et al (58), en el que no se encontraron diferencias en la PMP circulante entre los pacientes con EA y 31 controles sin demencia. Lee et al., observó que PMP circulante aumentaba tanto en pacientes con demencia cerebrovascular como en pacientes con demencia mixta cerebrovascular y EA, lo que sugiere que la medición de PMP circulante podría ayudar a distinguir la EA pura de la demencia de origen vascular (58).

En un estudio del 2001 se demostró que los PMP son capaces de activar células endoteliales macrovasculares mejorando la expresión superficial de ICAM-1 y produciendo IL-8, IL-1b e IL-6 (59). Además, pueden unirse a los neutrófilos circulantes, transferir receptores funcionales GPIIb / IIIa (CD41 / CD61), participando en la señalización inflamatoria (42). Una característica importante es que los PMP son más móviles que las plaquetas y por lo tanto son más susceptibles a la interacción con otros tipos de células (60).

En un estudio del año 2013 se informó que en un modelo de ratón y en el cerebro humano con EA, se acumula progresivamente A β en las micropartículas a medida que avanza la edad, y que el clivaje del sitio-b de APP ocurre dentro de éstas mismas (61).

Se estudiaron los cambios plasmáticos de las MP endoteliales (EMP) y plaquetarias en pacientes con EA con factores de riesgo vascular. Se observaron niveles plasmáticos significativamente más altos de MP en pacientes con EA con factores de riesgo vascular en comparación con los pacientes sin estos, y sujetos control. Se encontraron correlaciones significativas entre MP endoteliales circulantes, MP totales y PMP. Mientras que no se hallaron correlaciones significativas entre los niveles plasmáticos de EMP/PMP y los índices de deterioro cognitivo. De esta manera concluyeron que los niveles circulantes de EMP están influenciados por el estado de la enfermedad de la EA, y los niveles plasmáticos de MP y PMP están asociados con factores de riesgo vascular en pacientes con EA (62).

En un artículo brasileño publicado el año 2016 se estudió la posible relación entre las PMP con el proceso de envejecimiento, deterioro cognitivo y demencia, en simples palabras se enfocó en intentar demostrar un vínculo de estas vesículas con la EA. Además, se investigó su asociación con el perfil lipídico, estrés oxidativo y biomarcadores inflamatorios. Las PMP se determinaron en el plasma de 81 sujetos ancianos con y sin EA. No se observó diferencia

entre las muestras de pacientes con EA y el grupo control. Sin embargo, las comparaciones entre los productores altos y bajos de PMP si demostraron ser biomarcadores de perfiles lipídicos y oxidativos, observándose mayores niveles de PMP en portadores del alelo e4 de apolipoproteína E (APOE4) en comparación con los no portadores. De esta manera se concluyó que la relación en el grupo EA entre diferentes marcadores inflamatorios y PMP es una señal más fuerte de respuesta inflamatoria importante en esta enfermedad (38)

En un artículo publicado el año 2015 se demostró efectivamente que el LCR de pacientes con EA contenía niveles significativamente más altos de MP en comparación con los de donantes sanos, lo que podría estar relacionados con un aumento de la membrana y la muerte de las células neuronales en el sistema nervioso central. Sin embargo, la actividad de calpaína y los niveles de MP total y derivadas de plaquetas en sangre disminuyeron significativamente en los pacientes con EA, aunque si se determinó que los pacientes con un deterioro cognitivo rápido mostraron una actividad de calpaína inicial significativamente mayor en el plasma en comparación con pacientes con un deterioro cognitivo lento, lo que indica una asociación de la actividad de calpaína al inicio con la tasa de deterioro cognitivo en pacientes con EA. Los niveles reducidos de MP plaquetarias en pacientes con EA apuntan hacia una disminución de la activación plaquetaria en la cohorte examinada (27).

Se sabe que la EA produce alteraciones plaquetarias en varios niveles, como un aumento en la fluidez de la membrana, anomalías citoesqueléticas para un aumento del estrés oxidativo y flujos de calcio anormales (63). Zellner y compañeros de trabajo compararon el proteoma plaquetario de EA, Parkinson con sus correspondientes controles. Se encontró una proteína significativamente aumentada en EA, la cual se identificó como monoamina oxidasa-B (Mao-B), enzima que cataliza la descomposición del neurotransmisor dopamina. El ARNm de Mao-B también mostró una expresión significativamente mayor niveles en pacientes con EA. Este estudio de la proteómica plaquetaria muestra por primera vez, una

actividad enzimática elevada, así como la proteína Mao-B y los niveles de expresión de ARNm en pacientes con EA (64).

Se han reportado algunos importantes hallazgos: 1. Aumento de la actividad de calpaína y los niveles de MP en el LCR de los pacientes con EA. 2. Disminución de la actividad de calpaína y los niveles de MP en suero y plasma en pacientes con EA. 3. La evaluación combinada de la actividad de calpaína y los niveles de $A\beta_{42}$ en el LCR mejora la precisión diagnóstica en comparación biomarcadores tradicionales de EA ($A\beta_{42}$, h-tau y ptau181). 4. La actividad de calpaína en el LCR se correlaciona significativamente con los niveles de $A\beta_{42}$, p-tau181 y el deterioro cognitivo en pacientes con EA (27)

Las calpaínas han sido implicadas en la apoptosis neuronal y dado que la apoptosis conduce a la formación de MP, la activación de calpaína en las células neuronales de los pacientes con EA daría paso a la liberación de MP en el LCR (27). Los resultados obtenidos por Laske et al, mostraron claramente que el LCR de pacientes con EA contenía niveles significativamente más altos de MP en comparación con donantes sanos. Este aumento podría estar vinculado a un aumento del desprendimiento de membrana y la muerte de las células neuronales en el sistema nervioso central (27).

Por otro lado, ha habido un creciente debate sobre la posible actividad priónica de las MP en la EA. Donde se plantea la posibilidad de que los agregados $A\beta$ y tau puedan ser transmisibles, análogo a lo que ocurre con los priones. Esta hipótesis se deriva de experimentos realizados en ratones transgénicos que expresan $A\beta$ humano, se demostró que inyecciones intracerebrales de extractos de tejido cerebral que contenían placa amiloide de pacientes EA en ratones transgénicos, resultaron en un aumento en la formación de placa

amiloide. Esto indica que los agregados de A β podrían ser capaces de autoreplicarse en hospedadores susceptibles, similar a las propiedades de un prión (40).

En consecuencia, las MP podrían participar en la liberación activa de los factores patógenos y también en la propagación del proceso de la enfermedad neurodegenerativa. Joshi et al. (65) demostraron que MP de pacientes con AD eran directamente tóxicos para las neuronas cultivadas. Esta neurotoxicidad se debía a su capacidad para promover la solubilización de fibrillas de A β neurotóxicas. Por lo tanto, las MP no solo pueden actuar como transportadores de factores neurotóxicos, sino que también pueden contribuir activamente a la progresión de la EA. Sin embargo, se requieren pruebas adicionales para determinar si las MP actúan principalmente como un mecanismo de transporte o si su estructura molecular contribuye significativamente a la patología de la enfermedad (40).

5. CONCLUSIÓN

En un principio, las MP se consideraban como productos inertes liberados durante la activación plaquetaria, pero en base a la evidencia literaria, se puede decir que estas vesículas se han convertido en importantes mediadores de la comunicación celular, pudiendo ser reconocidas como biomarcadores de algunas enfermedades inflamatorias

En esta revisión bibliográfica, luego de analizar la documentación científica respecto a la participación de las micropartículas plaquetarias en la enfermedad de Alzheimer, se puede decir que estas vesículas poseen sin duda una actividad proinflamatoria, pero no se ha logrado demostrar una real correlación entre sus niveles en plasma con el desarrollo de esta patología.

Lo anterior no descarta a las MP como biomarcadores de otras enfermedades neuroinflamatorias dadas sus características físicas y el contenido que transporta, en donde destaca el péptido A β y microARN.

De esta manera las MP, podrían ser utilizadas para desarrollar diferentes estudios y ensayos para el diagnóstico temprano de ciertas patologías, pues el rol que desempeñan aún no está totalmente claro.

A continuación, se presenta una tabla resumen con algunos artículos científicos considerados en esta revisión bibliográfica, se expone de manera sucinta los principales resultados obtenidos en ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de artículos científicos considerados en esta revisión.

| Artículo | Resultado | Año | Ref. |
|--|--|------------|-------------|
| Proliferation of Internal Membranes in Platelets from Patients with Alzheimer's Disease | Aumento de la fluidez de la membrana plaquetaria en el grupo con EA, y dado que las membranas internas son más fluidas, significa que se produce una desregulación de la membrana plaquetaria. | 1987 | (56) |
| Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. | No se encontraron diferencias de PMP circulantes entre los pacientes con EA y 31 controles sin demencia. | 1993 | (58) |
| Platelet activation in Alzheimer disease. | No se encontraron mayores diferencias en el número de micropartículas plaquetarias ni en el recuento total de plaquetas. De esta manera se concluyó que la EA no pareció alterar la formación de PMP. | 1998 | (57) |
| Elevated CSF and plasma microparticles in a rat model of streptozotocin-induced cognitive impairment. | En el cerebro con EA, se acumula progresivamente A β en las micropartículas a medida que avanza la edad, y el clivaje del sitio-b de APP ocurre dentro de éstas. | 2013 | (61) |
| Microglia convert aggregated amyloid-β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles | MP participan en la liberación activa de los factores patógenos y también en la propagación del proceso de la enfermedad neurodegenerativa. MP de pacientes con AD eran directamente tóxicos para las neuronas cultivadas. | 2014 | (65) |

| | | |
|--|--|-----------|
| Increased cerebrospinal fluid calpain activity and microparticle levels in Alzheimer's disease | La actividad de calpaína y los niveles de MP total y derivadas de plaquetas en sangre disminuyeron significativamente en los pacientes con EA. | 2015 (27) |
| Elevated platelet microparticles levels are associated with lipidic oxidation and inflammatory profiles in Alzheimer's disease. | La relación en el grupo EA entre diferentes marcadores inflamatorios y PMP, es una señal más fuerte de respuesta inflamatoria importante en esta enfermedad. | 2016 (38) |
| Plasma microparticles in Alzheimer's disease: The role of vascular dysfunction. | Los niveles plasmáticos de PMP están asociados con factores de riesgo vascular en pacientes con EA. | 2018 (62) |

Elaboración propia (2019).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-88.
2. Farré AL. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición: *Rev Esp Cardiol;* 2013 [
3. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo PM, Valdespino-Castillo VE. [Cell signaling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism]. *Cir Cir.* 2015;83(2):165-74.
4. Cattabeni F, Colciaghi F, Di Luca M. Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004;28(5):763-70.
5. Garre-Olmo J. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Revista de Neurología.* 2018;66(11):377-86.
6. Aranda M, Calabria A. Impacto económico-social de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología Argentina.* 2019;11(1):19-26.
7. Donoso A. La enfermedad de Alzheimer. *Revista chilena de neuro-psiquiatría.* 2003;41:13-22.
8. Wollen KA. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev.* 2010;15(3):223-44.
9. Shou Y, Huang Y, Zhu X, Liu C, Hu Y, Wang H. A review of the possible associations between ambient PM2.5 exposures and the development of Alzheimer's disease. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;174:344-52.
10. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(6):926-35.
11. Itkin A, Dupres V, Dufrêne YF, Bechinger B, Ruyschaert JM, Raussens V. Calcium ions promote formation of amyloid β -peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011;6(3):e18250.
12. Albert Cabrera MJ, Martínez Pérez R, Gutiérrez Ravelo A, Hakim Rodríguez D, Pérez Davison G. Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Farmacia.* 2014;48:508-18.
13. Manzano-León N, Mas-Oliva J. Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta médica de México.* 2006;142:229-38.
14. Gra Menéndez S, Padrón Pérez N, Llibre Rodríguez JdJ. Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2002;21:253-61.
15. Weller RO, Nicoll JA. Cerebral amyloid angiopathy: pathogenesis and effects on the ageing and Alzheimer brain. *Neurol Res.* 2003;25(6):611-6.
16. Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, Michikawa M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem.* 2011;286(20):17536-42.

17. Gutiérrez Robledo LM, Rojas Mayorquin A, Gutiérrez Ávila H. Tópicos de actualización en neurobiología. Envejecimiento y neurodegeneración. 2018.
18. Angosto MC, González PG. Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de alzheimer. Estrés oxidativo. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009.
19. Beteta E. Neuropatología de las demencias. Revista de neuro-psiquiatría. 2004;67:80-105.
20. Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease. Front Cell Neurosci. 2015;9:65.
21. Gowert NS, Donner L, Chatterjee M, Eisele YS, Towhid ST, Münzer P, et al. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. PLoS One. 2014;9(2):e90523.
22. Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. Immun Ageing. 2012;9(1):20.
23. Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti AH. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. Mol Cell Biol. 2001;21(6):2213-20.
24. Ferreira A. Calpain dysregulation in Alzheimer's disease. ISRN Biochem. 2012;2012:728571.
25. Trinchese F, Fa' M, Liu S, Zhang H, Hidalgo A, Schmidt SD, et al. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. J Clin Invest. 2008;118(8):2796-807.
26. Morán MME-J. Calpaínas. Revista Médica MD. 2009;1(2).
27. Laske C, Stellos K, Kempter I, Stransky E, Maetzler W, Fleming I, et al. Increased cerebrospinal fluid calpain activity and microparticle levels in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2015;11(5):465-74.
28. Kniewallner KM, Ehrlich D, Kiefer A, Marksteiner J, Humpel C. Platelets in the Alzheimer's disease brain: do they play a role in cerebral amyloid angiopathy? Curr Neurovasc Res. 2015;12(1):4-14.
29. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. Circ Res. 2018;122(2):337-51.
30. Sharathkumar AA, Shapiro AD. Trastornos de la función plaquetaria. Tratamiento de la Hemofilia. 2008;19:1-22.
31. Mesa MG, Alfonso CC. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Rev Cubana Angiol y Cir Vasc. 2000;1(2):132-41.
32. Farré AL, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. Revista española de cardiología suplementos. 2013;13:2-7.
33. Veitinger M, Varga B, Guterres SB, Zellner M. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? Acta Neuropathol Commun. 2014;2:65.
34. Quintana-González S. Enfermedad de von Willebrand. Gac Med Mex. 2000;136(Supl 2):121-6.
35. Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. Medicina interna de México. 2018;34:244-63.
36. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. Blood. 2009;113(6):1332-9.
37. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. Clin Chem Lab Med. 2017;55(5):657-66.

38. Gonçalves GS, Duarte RCF, Campos FMF, Silva IdFO, de Sousa L, Faria MC, et al. Elevated platelet microparticles levels are associated with lipidic oxidation and inflammatory profiles in Alzheimer's disease. *European Geriatric Medicine*. 2016;7(4):352-9.
39. Nomura S. Microparticle and Atherothrombotic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(1):1-9.
40. Schindler SM, Little JP, Klegeris A. Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders. *Biomed Res Int*. 2014;2014:756327.
41. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
42. Porro C, Trotta T, Panaro MA. Microvesicles in the brain: Biomarker, messenger or mediator? *J Neuroimmunol*. 2015;288:70-8.
43. Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A*. 2016;89(2):111-22.
44. Grajales CM, Duque GMV. Micropartículas como sustrato antigénico en lupus eritematoso sistémico. *Inmunología*. 2012;31(3):78-82.
45. Doevre L, Plawinski L, Toti F, Anglés-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem*. 2009;110(2):457-68.
46. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011;108(10):1284-97.
47. Schlossmacher MG, Ostaszewski BL, Hecker LI, Celi A, Haass C, Chin D, et al. Detection of distinct isoform patterns of the beta-amyloid precursor protein in human platelets and lymphocytes. *Neurobiol Aging*. 1992;13(3):421-34.
48. Jin J, Wang J, Lu Y, Fan Z, Huang N, Ma L, et al. Platelet-Derived Microparticles: A New Index of Monitoring Platelet Activation and Inflammation in Kawasaki Disease. *Indian J Pediatr*. 2018.
49. Lam FW, Vijayan KV, Rumbaut RE. Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1265-80.
50. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(6):813-56.
51. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(9):961-6.
52. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.
53. Laffont B, Corduan A, Plé H, Ducheux A-C, Cloutier N, Boilard E, et al. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013;122(2):253-61.
54. Talib LL, Joaquim HP, Forlenza OV. Platelet biomarkers in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2012;2(6):95-101.
55. Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. Platelet microparticles as carriers of soluble Alzheimer's amyloid beta (sAbeta). *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:340-8.
56. Zubenko GS, Malinakova I, Chojnacki B. Proliferation of Internal Membranes in Platelets from Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1987;46(4):407-18.

57. Sevush S, Jy W, Horstman LL, Mao WW, Kolodny L, Ahn YS. Platelet activation in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998;55(4):530-6.
58. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res*. 1993;72(4):295-304.
59. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):277-87.
60. Nomura S, Inami N, Iwasaka T. Differences in functional roles between activated platelets and platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost*. 2007;98(5):1143-4.
61. Hosseinzadeh S, Zahmatkesh M, Zarrindast MR, Hassanzadeh GR, Karimian M, Sarrafnejad A. Elevated CSF and plasma microparticles in a rat model of streptozotocin-induced cognitive impairment. *Behav Brain Res*. 2013;256:503-11.
62. Hosseinzadeh S, Noroozian M, Mortaz E, Mousavizadeh K. Plasma microparticles in Alzheimer's disease: The role of vascular dysfunction. *Metab Brain Dis*. 2018;33(1):293-9.
63. Parguiña AF, Rosa I, García A. Proteomics applied to the study of platelet-related diseases: aiding the discovery of novel platelet biomarkers and drug targets. *J Proteomics*. 2012;76 Spec No.:275-86.
64. Zellner M, Baureder M, Rappold E, Bugert P, Kotzailias N, Babeluk R, et al. Comparative platelet proteome analysis reveals an increase of monoamine oxidase-B protein expression in Alzheimer's disease but not in non-demented Parkinson's disease patients. *J Proteomics*. 2012;75(7):2080-92.
65. Joshi P, Turola E, Ruiz A, Bergami A, Libera DD, Benussi L, et al. Microglia convert aggregated amyloid- β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ*. 2014;21(4):582-93.