

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**IMPORTANCIA DE LOS MODELOS
ANIMALES EN EL ESTUDIO
DEL SISTEMA PURINÉRGICO**

**DISCURSO DE INGRESO PRONUNCIADO POR LA
EXCMA. SRA. DOÑA.
MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL**

**EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
EL DÍA 23 DE ENERO DE 2012**

**Y DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL ACADÉMICO DE NÚMERO,
PRESIDENTE DE LA REAL ACADEMIA
DE CIENCIAS VETERINARIAS**

EXCMO. SR. D. ARTURO ANADÓN NAVARRO



**23 de enero de 2012
MADRID**

ISBN: 978-84-615-6567-2
Depósito legal: M. 1.836-2012
Imprime: REALIGRAF, S. A.
C/ Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

ÍNDICE

	<i>Págs.</i>
Palabras de agradecimiento	11
<i>Laudatio</i> del Excmo. Sr. D. Narciso Luis Murillo Ferrol	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Los primeros compuestos activos purificados y el estudio de sus propiedades	14
1.2. Necesidad y búsqueda de modelos animales de experimentación	15
2. PRIMEROS COMPUESTOS PURINÉRGICOS Y PIRIMIDINÉRGICOS, UNA BREVE HISTORIA	17
2.1. El modelo de los perros dálmata y cien años de estudio para comprender la excreción de ácido úrico	18
2.2. Aislamiento del segundo compuesto purinérgico y otros varios	19
3. PRIMEROS PASOS EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS EXTRACELULARES DE LOS COMPUESTOS PURINÉRGICOS	21
3.1. Importancia del modelo de administración de cafeína para discernir las acciones de la adenosina	23
3.2. Primeras evidencias de los efectos extracelulares del ATP y otros compuestos purinérgicos en el sistema nervioso	24
3.3. Nuevos modelos animales para confirmar al ATP como neurotransmisor: Importancia del modelo de la estimulación antidrómica de los nervios sensitivos	25
3.4. Liberación conjunta de nucleótidos y otros neurotransmisores clásicos	26

	<i>Págs.</i>
4. CONTENIDO NUCLEOTÍDICO DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN, DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS NUCLEÓTIDOS: LOS DIADENOSINA POLIFOSFATOS ApnA	29
4.1. Descubrimiento de los diadenosina polifosfatos en la Facultad de Veterinaria de la UCM	29
4.2. Modelos de secreción de nucleótidos en animales vivos: perfusión cerebral y lágrimas	31
5. TRANSPORTE DE NUCLEÓTIDOS AL INTERIOR DE LOS ORGÁNULOS DE SECRECIÓN: TRANSPORTADOR VESICULAR DE NUCLEÓTIDOS	33
5.1. Caracterización molecular del transportador de nucleótidos VNUT (SLC17A9) y su filogenia	36
5.2. Liberación de ATP al medio extracelular: Exocitosis <i>versus</i> no-exocitosis	38
6. PRIMERA CLASIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS Y SUS MODELOS DE ESTUDIO: RECEPTORES P1 Y P2	41
6.1. Receptores de adenosina, AR (P1) y sus modelos de estudio	42
6.2. Importancia de los ratones genéticamente modificados para comprender el papel fisiológico de los receptores de adenosina	44
6.3. Aspectos nutricionales en el desarrollo fetal en relación con los receptores de adenosina	44
7. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR: RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS P2	47
7.1. Receptores P2Y y su descubrimiento, relevancia de las técnicas de biología molecular	48
7.2. Aspectos singulares del receptor P2Y ₁₂ plaquetario y la farmacología antitrombótica	49
7.3. Principales cascadas de señalización de los receptores P2Y	51
8. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE NUCLEÓTIDOS, FAMILIA P2X: IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y LA ELECCIÓN DE LOS MODELOS DE ESTUDIO	55
8.1. Características estructurales y oligomerización de los receptores P2X	56

	<i>Págs.</i>
8.2. Estructura cuaternaria de los receptores P2X	58
8.3. Características funcionales y regulación de los receptores P2X	61
8.4. Aspectos fisiológicos de los receptores P2X deducidos de los ratones genéticamente modificados	63
8.5. El receptor P2X7: descubrimiento, los desconcertantes knock-out y complejidad de su procesamiento	64
8.6. Variantes SNP del receptor P2X7	67
8.7. Características farmacológicas del receptor P2X7	69
8.8. Señalización del receptor P2X7	71
9. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DEL RECEPTOR P2X7 EN LA MADURACIÓN NEURONAL Y DIVERSAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	73
9.1. Importancia del receptor P2X7 en el desarrollo del axón en neuronas embrionarias	74
9.2. Receptor P2X7 en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas: a) Modelos murinos de la enfermedad de Huntington	76
9.3. Receptor P2X7 en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas: b) Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer	77
10. DE HOMBRES Y RATONES: Y DE PECES, MOSCAS Y GUSANOS	79
BIBLIOGRAFÍA	81
DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL EXCMO. SR. D. ARTURO RAMÓN ANADÓN NAVARRO	101

*A mi esposo Fernando Varela
y mis hijos Fernando y Alberto*

**DISCURSO DE INGRESO
PRONUNCIADO POR LA
EXCMA. SRA. DOÑA MARÍA TERESA
MIRAS PORTUGAL**

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España, Don Arturo Anadón Navarro,

Excmas. Señoras y Señores Académicos,

Señoras y Señores:

Las primeras palabras de las que quiero dejar constancia al leer el discurso de entrada en la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España son las de profundo agradecimiento a todos los Académicos de esta Real Institución.

Agradecer de modo especial la gentileza y amabilidad del Excmo. Sr. Don Arturo Anadón Navarro, Presidente de esta Real Institución, compañero y amigo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por el gran honor que me hace al responder a mi Discurso de Ingreso.

Permítanme recordar a quien fue su anterior presidente Excmo. Sr. Don Carlos Luis de Cuenca, fallecido prematuramente, por la confianza y el interés que mostró en mi persona sugiriendo mi candidatura. En igual medida al anterior presidente también fallecido, Excmo. Sr. Don Mariano Yllera, compañero y amigo de nuestra facultad. Bajo el mandato de ambos Presidentes esta Real Academia recibió el impulso definitivo adquiriendo la relevancia que le corresponde.

De modo muy especial agradezco el gran honor que me han otorgado los Excmos. Señores Académicos que han presentado mi candidatura: Excmo. Sr. D. Guillermo Suárez, Excmo. Sr. Don Tomás Pérez y Excmo. Sr. Don Antonio Ramón Martínez Fernández, que han dado muestras de su gran generosidad y facilitando que me encuentre hoy entre ustedes.

Permítanme señalar que el Excmo. Sr. Don Guillermo Suárez era Decano de la Facultad de Veterinaria de la UCM cuando me incorporé a la cátedra de Bioquímica y Biología Molecular en 1986. Constaté, entonces, su gran personalidad, su eficacia al dirigir una institución cuyo reto era modernizarse e igualarse con sus homólogas europeas, lo cual logró. El gran bagaje científico del Don Guillermo Suárez y su visión de que solo la ciencia de calidad es universal, atrajo en torno a él un excepcional plantel de jóvenes investigadores veterinarios formados en los centros de investigación más prestigiosos del mundo. Gracias, Don Guillermo, por haber sabido crear el ambiente de calidad necesario para poner las bases del siglo XXI en nuestra Facultad.

Dar las gracias también al Excmo. Sr. Don Tomás Pérez, compañero y amigo de tantos años en nuestra facultad, al que me une el afecto y la amistad de los que han tenido que compartir los múltiples problemas del día a día docente. Gran conocedor del medio, tuve la inmensa suerte de contar con su apoyo en situaciones complejas, cuando nuestras respectivas asignaturas superaban con creces los mil alumnos. Con un encomiable sentido de las posibilidades de canalizar la realidad y una infatigable entrega, sus consejos fueron de gran ayuda y siempre he de decir originales.

Agradecer, de igual modo, al Excmo. Sr. Don Antonio Ramón Martínez Fernández, gran parasitólogo veterinario y catedrático de la Facultad de Farmacia de Madrid, compañero y amigo de la Real Academia Nacional de Farmacia, de la cual es actualmente Vicepresidente y cuya labor y buen hacer quiero agradecer aquí ante todos ustedes.

En este acto de gran significado para mí, cuento con la presencia de mi esposo Fernando Varela y mis hijos Fernando y Alberto. Ellos son la razón más importante de mi vida y siempre he contado con su apoyo y cariño en este exigente camino de la ciencia experimental.

LAUDATIO DEL EXCMO. SR. D. NARCISO LUIS MURILLO FERROL

Honor es debido a mi predecesor en la Medalla número 44 de Ciencias Afines a la veterinaria, el Excmo. Sr. Don Narciso-Luis Murillo Ferrol, quien al pasar a Académico Supernumerario ha dejado vacante la medalla de ciencias afines. Su gran labor en esta Real Academia ha sido encomiable y deseo fervientemente ser una digna sucesora de su dedicación y esfuerzo.

El Excmo. Sr. Don Narciso-Luis Murillo Ferrol se licenció en Medicina en Granada, en 1955, leyendo su tesis doctoral en la misma universidad en 1958. Desarrolla muy pronto su vocación docente en la propia Universidad de Granada obteniendo por oposición la plaza de Profesor Adjunto de Anatomía en la misma universidad donde ejerce desde 1958 hasta 1961 en que se traslada a la facultad de Medicina de Madrid. En su nuevo destino realiza una labor docente de amplio espectro, compaginándola con la escuela de especialización en traumatología, ortopedia y rehabilitación del Hospital Clínico Universitario de Madrid. Obtenida la Cátedra de Anatomía descriptiva y Embriología en 1967, se traslada a la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza donde desempeñó cargos de máxima relevancia. Fue Rector de la Universidad de Zaragoza desde 1974 a 1978, y miembro de la conferencia permanente de Rectores y Vicecancilleres de las Universidades Europeas.

Su formación investigadora con numerosas estancias en centros extranjeros ha quedado reflejada en revistas especializadas y por sus conocimientos y buen hacer ha sido un elemento clave en evaluaciones en la Dirección General de Política Científica y en la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Me siento orgullosa de recoger su antorcha y espero poder servir a esta Real Academia con la misma eficacia y entrega.

1. INTRODUCCIÓN

La supervivencia de nuestra especie y su éxito colonizador ha requerido de unas poderosas dotes de observación para adaptarse a nuevos ecosistemas y diferenciar las especies útiles de las peligrosas para alimentarse y aliviar sus enfermedades. Las diferentes culturas catalogaron especies animales y vegetales de utilidad en tratamientos diversos y otras de gran toxicidad, todas ellas, sin duda, requirieron de generaciones experimentando directamente sus bondades y sus peligros. Las grandes civilizaciones, empezando por la egipcia, han dejado constancia de ese conocimiento, en este caso solamente una pequeña muestra, pero de gran valor, ha llegado hasta nuestros días, como la recogida en el papiro de Ebers y el de Edwin Smith.

La literatura clásica griega y latina y sus mitologías también nos dan información de la amplia utilización de preparados para mejorar la salud y la cultura generalizada que existía para la utilización eficaz de los venenos, sobre todo con fines sucesorios. No existe referencia alguna a que esos venenos fueran ensayados previamente en animales y es muy probable que fueran «probados» con los sirvientes esclavos. La familia de las amanitas, sobre todo la *Amanita Phalloides*, fácil de confundir con el delicado manjar de la *Amanita Cesarea*, fueron según Pedanio Dioscórides: «las viandas delicadas que hicieron mucho mal a los emperadores romanos».

La escuela de Medicina de Alejandría en el siglo primero y comienzos del segundo después de Cristo, era una de las más avanzadas y Galeno en sus obras hace referencia a los estudios anatómicos realizados por dos de sus sabios más destacados, los anatomistas y fisiólogos Herófilo y Erasístrato, cuyos datos procedían de la observación directa obtenidos por disección de cadáveres. La prohibición estricta de la disección de cadáveres en la antigua Roma, hizo que Galeno, originario de Pérgamo y educado en el arte de la medicina en Alejandría, realizara estudios anatómicos y vivisecciones en cerdos y monos, sin olvidar que fue médico de una escuela de gladiadores donde los destrozos en el cuerpo humano *in vivo* daban mucha información.

Durante los siglos posteriores al Imperio Romano hasta el siglo XVI, se mantiene el mismo modo de pensar en materia médica, sin avances significativos respecto a la antigüedad romana, hasta que Andrés Vesalio publica *De humani corporis fabrica* (*Sobre la estructura del cuerpo humano*), en donde incluye los datos de las disecciones de los cadáveres de criminales ajusticiados que por orden de un juez de Padua se le deberían

de facilitar. La obra está dedicada al Emperador Carlos V y la versión para estudiantes al Príncipe Felipe, su sucesor, posteriormente coronado como Felipe II.

Los medicamentos en uso hasta el siglo XVI tenían mucho de mágico y los que realmente eran eficaces utilizaban sustancias relativamente poco tóxicas, tal vez sea esa la razón por la que no se plantearan ensayos de eficacia y de control, siendo los únicos estudios los realizados para detectar adulteraciones según su textura, sabor, olor y características visuales.

1.1. Los primeros compuestos activos purificados y el estudio de sus propiedades

La gran revolución en el mundo de las sustancias medicinales se inicia con la llegada de las plantas del nuevo mundo americano y prosigue al purificar e identificar los compuestos activos de los extractos de las plantas medicinales con demostrada eficacia. Es la morfina purificada del opio en 1803 por el farmacéutico alemán Friedrich Sertüner, el primer alcaloide que como sustancia pura es accesible para el tratamiento terapéutico.

La corteza del sauce blanco (*Salix alba*) ha sido utilizada por las primeras civilizaciones del Mediterráneo y Eurasia para el alivio de la fiebre y del dolor, Hipócrates en el siglo V antes de Cristo lo incluye entre los medicamentos más útiles. En 1853 el químico francés Charles Frederic Gerhardt fue el primero en aislar el ácido salicílico de la materia prima vegetal y después estabilizarlo mediante acetilación, pero nunca pensó en su utilización como fármaco. Sería años más tarde en 1897 cuando el químico alemán Felix Hoffmann trabajando para la empresa Bayer, redescubre los trabajos anteriores y aísla el ácido salicílico. La gran diferencia es que su padre sufría de fuertes dolores de artritis y decide administrarle la sustancia purificada. Los resultados fueron excelentes y acetila el compuesto produciendo la aspirina para estabilizar y evitar acciones secundarias sobre el aparato digestivo. El nombre del compuesto hace mención al proceso de acetilar, introduciendo la A inicial, y a la planta *Spirea*, muy abundante en nuestros jardines, de donde también se había aislado el ácido salicílico. Actualmente sería inaceptable actuar de modo tan arriesgado administrando compuestos cuyo efecto se desconoce.

Un ejemplo diferente nos lo proporciona el ácido barbitúrico que fue sintetizado por vez primera en 1894 por Adolf von Bayer y que de modo inmediato se procedió a sintetizar una gran variedad de derivados para su potencial uso terapéutico. El éxito llega en 1903 cuando dos químicos de la Compañía Bayer, Emil Fischer y Joseph von Mering, descubrieron que el barbital era muy eficaz para dormir a los perros. El perro de ensayo era el animal de compañía de la familia. Del modelo animal se pasa rápidamente al humano y tanto Fischer como Mering murieron siendo adictos al barbital. La historia prosigue con el empleo del fenobarbital como anticonvulsivante en las crisis epilépticas, descubierto de modo casual por el médico alemán Alfred Hauptmann, cuando lo administró a los pacientes del

hospital psiquiátrico de Friburgo para tranquilizarlos e inducirles sedación. Aquellos que estaban internados por las crisis epilépticas que les impedían hacer vida normal, vieron disminuidas sus crisis y en muchos casos, los menos graves, salir de la institución y reintegrarse al trabajo. Alfred Hauptmann publica sus resultados en 1912, bajo el título: *Luminal bei epilepsie*. Se inicia con este descubrimiento una nueva era para el tratamiento exitoso de la epilepsia y el descubrimiento de múltiples familias de fármacos actuando sobre canales iónicos.

De vuelta a su origen, el fenobarbital se sigue usando para tratar la epilepsia canina y felina. También se usa en el tratamiento de las convulsiones de los caballos cuando no responden a las benzodiazepinas. En humanos ha dejado de usarse.

Los ejemplos exitosos aquí reseñados sirven para ilustrar una práctica que seguramente estaba ampliamente extendida: la de probar en el entorno inmediato familiar o del trabajo las nuevas sustancias purificadas de extractos de las plantas medicinales, o sintetizadas por la química orgánica durante el siglo XIX y primeros años del siglo XX. Por lógica es de suponer que hubo muchos fracasos y envenenamientos de los cuales no tenemos información ya que habrán sido celosamente ocultados. Esta posibilidad y el elevado número de compuestos susceptibles de ser probados, junto con las connotaciones económicas que conlleva descubrir nuevas sustancias medicamentosas, pusieron de manifiesto la necesidad de canalizar y racionalizar estos experimentos buscando modelos animales de estudio.

1.2. Necesidad y búsqueda de modelos animales de experimentación

El camino hacia la utilización de animales de experimentación fue arduo y no parecía cuajar en la dinámica terapéutica y toxicológica, siendo el propio entorno científico y social reacio a aceptar esa práctica. Escasos ejemplos realizados como exhibición en clases prácticas contaban con el empleo de animales de experimentación a mediados del siglo XIX.

El cambio de mentalidad se produce cuando el eminente médico y fisiólogo francés Claude Bernard, que comenzó como mancebo de farmacia en Lyon y que entre sus labores se encontraba el de llevar a la Facultad de Veterinaria de esa ciudad los medicamentos que se administraban a los animales, comienza a experimentar con ellos siguiendo la influencia de su profesor François Magendie con quien se encuentra en 1843. El descubrimiento de la acción del curare, sobre la placa motora bloqueando la ventilación pulmonar y su reversibilidad con ventilación mecánica realizada en directo frente al alumnado y sobre animales de gran tamaño, le da el impulso definitivo a la necesidad de la experimentación animal para comprender la fisiología, y la farmacología y farmacodinamia. Su obra más conocida y considerada un texto clásico dentro del pensamiento científico es la titulada *Introducción al estudio de la medicina experimental*, que fue publicada en 1865.

Para Claude Bernard la experimentación se hace indispensable y es necesario enfrentarse con la mente totalmente abierta, sin estar sometido de modo incondicional a teorías previas. Esta postura la definió con una frase célebre: *«El científico debe de tener una fe robusta y no creer»*.

Claude Bernard ingresó en la Académie des Sciences en 1854 y en la Académie de France en 1868. La escasa acogida de la investigación animal y el rechazo social a tal práctica la vivió en el seno de su propia familia. La esposa de Claude Bernard pidió la separación y fundó, junto a sus dos hijas, un asilo para perros y gatos, dejando así clara constancia de su oposición a la experimentación con animales. Esta situación vivida en el año 1869 por el iniciador de la medicina experimental moderna, no nos resulta en absoluto extraña 150 años más tarde.

En estos últimos 100 años la experimentación con modelos animales ha sido acogida como necesaria, aunque siempre ha habido activistas más o menos agresivos interfiriendo en su empleo. En los ámbitos clínico terapéuticos existe el convencimiento de que gracias a su utilización disponemos de medicamentos seguros que han sido una panacea para el sufrimiento humano. En este cambio de siglo del XX al XXI estamos asistiendo a un giro en la percepción de su necesidad, con críticas cada vez más amplias y desde diferentes ángulos de la sociedad a la utilización de animales en estudios básicos y clínicos.

La búsqueda de modelos alternativos de experimentación animal y las prácticas en muchas facultades de ciencias de la vida, incluidas algunas de veterinaria, con modelos exclusivamente virtuales, si bien ayudan a la comprensión de los modelos biológicos, producen también una lejanía del mundo real tangible en el cual los profesionales de ciencias de la Vida y la Salud deben de forjarse. Un equilibrio entre virtual y real es necesario para formar profesionales competentes. Esto no está reñido con la existencia de unos principios éticos y de buenas prácticas que deben de regir el empleo de animales en la experimentación biomédica. La existencia de cursos de Formación de distintos niveles y un Máster de buenas prácticas en modelos de experimentación animal de los cuales las facultades de Veterinaria de nuestro país han sido impulsoras y pioneras es un buen modo de reconciliar a la sociedad con la necesaria experimentación animal.

Justo es decir que los recortes en la financiación de las universidades siempre inciden negativamente en las clases prácticas, que son y han sido el caballo de batalla por su precariedad en todos los planes de estudio de nuestro país. Los estudios de ciencias de la Vida y la Salud son, como su nombre indica, estudios de ciencias, donde el cambio de paradigmas es una de sus premisas y el motor del progreso.

2. PRIMEROS COMPUESTOS PURINÉRGICOS Y PIRIMIDINÉRGICOS, UNA BREVE HISTORIA

Entrando en el terreno de la señalización purinérgica, todo el conocimiento acumulado sobre los receptores de nucleósidos (adenosina, receptores A) y nucleótidos (receptores P2), sus sistemas de liberación, transporte vesicular, y los enzimas de destrucción extracelular, las ectonucleotidasas, considerado como conjunto recibe actualmente la denominación de sistema purinérgico. El interés científico por el sistema de señalización purinérgico es muy reciente y por ello su estudio se ha beneficiado de las nuevas tecnologías de biología y genética molecular y los modelos animales en donde la modificación de su dotación genética ha sido una constante.

Un desarrollo histórico de los descubrimientos que llevaron a formular la entidad de la señalización extracelular mediada por derivados de purinas y pirimidinas, nos servirá de guía para conocer los modelos en que se ha fundado.

En los libros de texto de Fisiología, Bioquímica y Patología Molecular, los capítulos dedicados a las purinas y pirimidinas se encuentran entre los más complejos. La razón de ser estriba entre otras muchas en: 1) los numerosos enzimas implicados en su síntesis y la compleja regulación de sus niveles; 2) la versatilidad de los compuestos derivados, desde estructurales como material genético formando los ácidos nucleicos, los coenzimas intermediarios en reacciones enzimáticas; 3) ser la moneda que sirve de base a las reacciones y procesos biofísicos que necesitan energía, desde gradientes iónicos a cambios conformacionales en el movimiento de las proteínas del músculo; 4) también la etapa de eliminación mediante los numerosos enzimas catabólicos implicados, de cuya existencia se tuvo noticia por las frecuentes alteraciones genéticas que producían acúmulos nocivos, estando entre los primeros errores del metabolismo para los que se estableció una base hereditaria.

Ahora hay que añadir a todo el bagaje anteriormente citado las acciones extracelulares de los compuestos purinérgicos como moléculas de señalización, lo que implica la existencia de receptores, su liberación controlada, su eliminación del medio extracelular y finalmente tratar de comprender los aspectos fisiológicos y patológicos de la señalización mediada por sus receptores. Cerrando el párrafo podemos decir que la complejidad la hemos extendido a la Farmacología, donde cada vez es más amplia la parte dedicada a los nuevos compuestos actuando sobre el sistema purinérgico. Será esta parte la que desarrollaremos con mayor precisión.

El año 1776 a partir de cálculos renales, el farmacéutico sueco Carl Wilhelm Scheele, aísla el primer compuesto purinérgico, el ácido úrico (Scheele, V. Q. *Examen Chemicum Calculi Urinari, Opuscula*, 1776, 2,73).

No me resisto a comentar que los humanos carecemos del enzima uricasa y excretamos el anillo de purinas como ácido úrico. Su exceso en sangre y precipitación en articulaciones causa la artritis aguda, también conocida como gota. El incremento de ácido úrico en sangre puede deberse a incremento de la síntesis de *novo* de purinas, o a fallos en las vías de recuperación, disminución de la excreción renal, etc. El enzima uricasa se encuentra en los peroxisomas hepáticos, a donde el ácido úrico tiene que entrar para ser metabolizado a alantoína (Vitart *et al.*, 2008). Una clasificación del metabolismo de las purinas en mamíferos fue realizada por Hunter & Givens en una época tan temprana como 1914. Encontraron que el hombre y el chimpancé excretaban ácido úrico, mientras que otras especies, como los mamíferos carnívoros y roedores lo excretaban como alantoína, que es mucho más soluble. Sabemos hoy día que los peroxisomas humanos y de los primates carecen del enzima uricasa, debido a mutaciones en el gen ancestral y previo a su divergencia evolutiva.

2.1. El modelo de los perros dálmata y 100 años de estudio para comprender la excreción de ácido úrico

Los perros estaban perfectamente encuadrados en el grupo de los animales no primates, hasta que estudiaron el perro dálmata, que contradecía la hipótesis general. En fecha tan temprana como 1916, Benedick descubre que al contrario de los de su especie, el perro dálmata no era capaz de metabolizar el ácido úrico, siendo semejante a los humanos en ese particular concreto. El perro dálmata se convirtió en un modelo de estudio de formación de cálculos renales para analizar efectos de la alimentación y fármacos. Ahora que han pasado muchos años y tenemos tecnologías más poderosas era necesario plantear la pregunta desde otro ángulo: ¿Cuál es el enzima, o sistema que falla en el perro dálmata para que no pueda hidrolizar el ácido úrico?

La respuesta fue inesperada, como todo en ciencia, sobre todo si uno tiene una «hipótesis sólida» detrás. La primera sorpresa fue que los peroxisomas hepáticos del dálmata contienen el enzima uricasa, también denominada urato oxidasa y con los mismos niveles de actividad que las otras razas caninas. Por lo tanto el problema no está en un fallo del enzima, mientras que en los humanos sabemos actualmente que el gen que codifica por el enzima urato oxidasa (UOX) en el hígado ha estado sometido a mutaciones que han conducido a su silenciamiento (Safrá *et al.*, 2005). Los perros dálmata, lo mismo que todos los perros, tiene su gen UOX perfectamente funcional y abundante cantidad de urato oxidasa en los peroxisomas hepáticos.

La pregunta sigue en pie: ¿Cuál es el fallo que hace que los dálmatas no metabolicen el ácido úrico? Experimentos con sobrecarga de ácido úrico

en sangre de distintas razas de perros parecían apuntar a que el hígado del dalmata no transporta bastante urato al interior para ser metabolizado. Esta posibilidad se ha confirmado recientemente con el descubrimiento de un transportador de urato en la membrana plasmática del hepatocito y de los túbulos renales, codificado por el gen SLC2A9, el cual presenta mutaciones en el perro dalmata que lleva a hiperuricosuria e hiperuricemia, ya que el sustrato úrico no es accesible al enzima de degradación al no ser transportado a través de la membrana plasmática de la célula del hepatocito (Banasch *et al.*, 2008).

Se han necesitado casi 100 años hasta poder elucidar por completo los aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos de la excreción de ácido úrico en el perro dalmata y la razón ciertamente complicada de su no metabolismo. Este es un ejemplo de la necesidad de disponer de una mente abierta a todas las posibilidades y mucha humildad cuando se trabaja en ciencia experimental y con modelos animales.

2.2. Aislamiento del segundo compuesto purinérgico y otros varios

Medio siglo más tarde del aislamiento del ácido úrico, se aísla el segundo compuesto purinérgico, la guanina. Esta base púrica fue purificada por Unger en 1844, a partir del guano, abono proveniente de los excrementos de pájaros. A partir de este momento los descubrimientos en el campo purinérgico se aceleran y al final del siglo XIX una amplia variedad de compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos habían sido identificados. Son notables los trabajos de Emil Fisher, quien consiguió identificar las bases xánticas, entre ellas la cafeína y sus compuestos relacionados, elucidar su estructura y sintetizarlas químicamente, otros muchos compuestos purinérgicos fueron estudiados y dieron un empuje definitivo al conocimiento de este grupo de sustancias (Fisher 1881; 1907). Emil Fisher recibió el Premio Nobel de química en 1902, en gran medida gracias a sus estudios sobre las estructuras purínicas. La cafeína sería posteriormente un utensilio valiosísimo para definir las acciones propias de la adenosina sobre sus receptores.

El término pirimidinas fue introducido por Pinner en 1895 al descubrir el uracilo, timina y los compuestos intermediarios de su metabolismo. La naturaleza de los azúcares que se unían a las bases púricas y pirimidínicas para formar los nucleósidos y los nucleótidos derivados fue una ardua tarea que permitió hacer entrar las pentosas en el campo bioquímico y se prolongó hasta bien entrado el siglo XX. La ribosa fue descubierta por Paul Levene en 1905, siendo investigador del Instituto Rockefeller de Bioquímica, de ahí su nombre (**R**ockefeller **I**nstitut of **B**iochemistry) y la terminación osa dada a los azúcares.

El primer nucleótido descrito fue la adenosina monofosfato, AMP, aislado del músculo esquelético (Embden and Zimmermann, 1927). Poco después, en 1929, se aisló e identificó la adenosina 5'-trifosfato, ATP. Dos grupos independientes se disputan su descubrimiento, el de Karl Lohmann en Alemania y el de Cyrus Hartwell Fiske y Yellagapada SubbaRow en

Estados Unidos (Fiske and SubbaRow, 1929; Lohmann, 1929), dando lugar a uno de los capítulos más apasionantes en el estudio de los compuestos nucleotídicos. El material de partida para aislar los nucleótidos era generalmente el músculo animal, sobre todo el esquelético y cardíaco, pues es donde se encuentra la mayor concentración, aunque posteriormente se aísla de todo tipo de preparaciones biológicas. El gran avance sobre el significado del ATP y su importancia habría de esperar más de una década hasta que Fritz Lipman introduce el concepto de enlace fosfato de alta energía, abriendo el horizonte para comprender el excepcional papel del ATP en la bioenergética celular y la estrecha conexión entre la bioquímica metabólica y la biofísica (Lipman, 1941). La relevancia de los nucleótidos de adenina, fundamentalmente el ATP, en el metabolismo y como componentes estructurales de partida para los ácidos nucleicos, apantallaron durante casi un siglo la importancia como mensajero extracelular y sus mecanismos de señalización.

3. PRIMEROS PASOS EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS EXTRACELULARES DE LOS COMPUESTOS PURINÉRGICOS

La presencia de adenina en sangre fue descrita en 1914, posiblemente como parte de la molécula de AMP, pero no es hasta 1920 en que Freund inyecta adenosina directamente en sangre en voluntarios humanos y descubre que tiene efectos cardiovasculares disminuyendo la presión sanguínea, aunque de modo fugaz (Freund, 1920). Otros investigadores inyectaron en humanos diversos extractos más o menos puros de adenina, o de adenosina, con resultados muy confusos. En aquellas primeras épocas de lo que se disponía era de extractos cardíacos o de músculo esquelético, enriquecidos en una mezcla de nucleótidos con muchas impurezas. La confirmación de que la adenosina y los ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) ejercían poderosos efectos farmacológicos en corazón y en músculo liso surge de los estudios de Drury y Szent-Györgyi publicados en 1929 (Drury & Szent-Györgyi, 1929). Esta publicación se considera como el inicio del estudio sistemático de las acciones de nucleósidos y nucleótidos como agentes farmacológicos y fueron realizados fundamentalmente con extractos musculares enriquecidos en estos compuestos. No debemos olvidar que la estructura del ATP había sido descrita ese mismo año de 1929.

La necesidad de trabajar con compuestos purificados fue una obsesión para el grupo de Drury, pues era consciente de la heterogeneidad de los preparados utilizados con posibilidad de acciones antagónicas. Con esta filosofía utilizando compuestos nucleotídicos y nucleosídicos más purificados, confirmaron la potente acción vasodilatadora sobre las arterias coronarias de estos compuestos (Bennet and Drury, 1931; Wedd and Drury, 1934). Para estos trabajos necesitaron poner a punto la tecnología de perfusión cardíaca, utilizaron perros, gatos, conejos, cobayas, y un largo etc. En estos animales median la dilatación de las arterias coronarias, en otros modelos de órganos y animal entero estudiaron los efectos en la circulación renal (Houck *et al.*, 1948) y en la circulación pulmonar (Gaddum and Holtz, 1933). La disponibilidad de un preparado denominado *Lacarnol*, que consistía en un preparado de nucleótidos obtenido de extractos musculares, y que era comercial, animó a Rothman en 1930, a utilizarlo en humanos (Rothman, 1930). Los primeros ensayos resultaron prometedores, pero la utilización repetida acabó por demostrar que los efectos eran de escaso potencial terapéutico. En trabajos posteriores de Drury (1936), con el modelo experimental del cobaya, las acciones de la adenosina parecen diferenciarse claramente de las del ATP. Por si faltaba algo los trabajos de

(Kalckar and Lowry, 1947) pusieron de manifiesto que hasta la fecha la mayoría de las preparaciones eran extremadamente impuras y que los nucleótidos inyectados sistémicamente en cualquier modelo sufrían un metabolismo extracelular demasiado rápido para poder asignar la acción correspondiente. Con preparaciones más purificadas, los experimentos de Loewi (1949) confirman los resultados de Drury, pero la dificultad de disponer de análogos del ATP que fueran funcionales y estables, o algún tipo de antagonista natural, o veneno, frenó el campo purinérgico. En la época inmediata a la finalización de la Segunda Guerra Mundial se hicieron muy frecuentes los experimentos con ancianos voluntarios, sufriendo de problemas circulatorios y/o cardíacos, sobre todo en centros geriátricos.

Aunque la actividad de los compuestos purinérgicos sobre el sistema cardiovascular era la más llamativa, las acciones sobre otras preparaciones experimentales fueron también descritas, destacando la motilidad intestinal y la contracción uterina inducida por ATP (Deuticke, 1932; Watts, 1953).

La segunda guerra mundial da un giro a la investigación sobre la señalización purinérgica, la hipótesis de partida es que si los tejidos, sobre todo el músculo, eran extremadamente ricos en ATP, en buena lógica, su aplastamiento y heridas de bala deberían de liberar cantidades elevadas de este compuesto a la sangre. Dos investigadores Green y Stoner, se interesaron por las heridas de bala y publican posteriormente un libro, *Biological actions of Adenine Nucleotides* en 1950. En este libro correlacionan la actividad con el número de fosfatos, siendo el ATP el más activo. La enorme heterogeneidad de los compuestos purinérgicos, la labilidad de sus grupos fosfato, la ausencia de claros receptores y de compuestos análogos que tuvieran una acción clara, hizo que los investigadores se centraran en otros sistemas de señalización de más fácil abordaje, como las catecolaminas o la acetilcolina. Los experimentos aplicando sistémicamente ATP, tanto en animales como humanos prosiguieron durante la década de los cincuenta, adoleciendo de los mismos obstáculos que en los treinta años anteriores.

En la década de 1960 comienzan a utilizarse modelos más simples y más fáciles de controlar experimentalmente. La preparación de las bandas musculares del intestino grueso de cobaya, conocido como *taenia coli* en la bibliografía anglosajona hace referencia a cada una de las tres bandas musculares longitudinales del intestino grueso de los mamíferos. Una vez aislado y libre de la mucosa se corta en tiras longitudinales y una vez colocado en un baño de órganos y mediante un miógrafo sirvió para medir de forma fiable los efectos contráctiles de muchas sustancias. En este modelo se demostró que el ATP aplicado exógenamente suprimía la actividad eléctrica espontánea, produciendo la hiperpolarización de la membrana muscular. En estos experimentos se identifica claramente que es el ATP el nucleótido que tiene mayor actividad y que el AMP y la adenosina tenían una actividad casi inexistente (Axelsson *et al.*, 1965; Axelsson and Holmberg, 1969).

La acción del ATP como agente estimulador de la secreción de insulina es especialmente relevante, pues es la primera referencia a su efecto sobre

tejidos secretores de naturaleza endocrina y neuroendocrina. Estos trabajos fueron realizados por el grupo del profesor Rodríguez-Candela, en el centro de Investigaciones Biológicas de Velázquez, en el que se encontraba el Instituto de Endocrinología. Este Instituto recibió más tarde el nombre de Instituto Gregorio Marañón, que fue su primer director, siendo el profesor Rodríguez Candela su sucesor en el cargo y del que era director cuando se hacen estos estudios (Rodríguez-Candela and García-Fernández, 1963). Este eminente médico y endocrinólogo adquirió un amplio renombre en modelos experimentales para el estudio de la diabetes, entre ellos en ranas, ratas y en perros donde pone a punto la perfusión pancreática. Utiliza también las rodajas de páncreas para medir secreción y mecanismos de modulación de la secreción. Sus artículos de gran originalidad están recogidos en varias publicaciones de la revista *Nature* y otras revistas clínicas y de endocrinología experimental de similar nivel, en una época de extrema dureza para la investigación española.

3.1. Importancia del modelo de administración de cafeína para discernir las acciones de la adenosina

En 1963 dos grupos, el de Berne en Estados Unidos y el de Gerlach en Alemania, reformulan la hipótesis de que la Adenosina era el auténtico compuesto fisiológicamente activo que mediaba en la vasodilatación coronaria como respuesta a la hipoxia (Berne, 1963; Gerlach *et al.*, 1963). Como hipótesis de partida estaba el hecho experimental de que los niveles de ATP en el miocardio descendían en hipoxia y que la pérdida de la carga energética conducía a la mayor formación y liberación del nucleósido matriz, la adenosina. Una vez en el espacio extracelular era la adenosina la que actuaba sobre receptores específicos. Los modelos de estudio fueron el corazón de gato en perfusión y la preparación del sinus coronario del corazón de perro. Esta hipótesis hizo avanzar los estudios de la adenosina y sus receptores que eran un objetivo más simple conceptualmente y para el que pronto se dispuso de poderosos análogos que actuaban como agonistas o antagonistas. No obstante, la hipótesis resultó solo cierta en parte, ya que incluso en hipoxia el corazón libera ATP, y su acción puede inducir a las células de los endotelios vasculares a producir óxido nítrico, NO, que es el responsable de la subsecuente vasodilatación.

Entre los compuestos empleados como antagonistas aparecen las metilxantinas, siendo la cafeína el compuesto más eficaz para inhibir la acción de la adenosina, y durante mucho tiempo el único que permitió establecer diferencias fiables entre receptores de adenosina y los de nucleótidos. Merece la cafeína un comentario extenso, ya que el modelo de administración de cafeína a ratas y sus efectos sugerían un posible mecanismo para explicar las acciones devastadoras de una enfermedad hereditaria: el síndrome de Lesch Nyham y la automutilación. Los afectados tienen ausencia de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa —HGPRT— (EC 2.4.2.8). El gen se encuentra localizado en el cromosoma X, por lo tanto

se transmite de forma autosómica recesiva, siendo los varones los que generalmente sufren la enfermedad. La escasa recuperación de las bases hipoxantina y guanina origina que se acumulen en los líquidos extracelulares y en sangre y un incremento de la presencia de ácido úrico que es su producto catabólico. Esto explica la presencia de cálculos de urato en riñón, y todos los síntomas de gota. ¿Pero, como explicar los devastadores efectos sobre el sistema nervioso de los niños, con profundo retraso mental y automutilación, devorando sus propios labios y falanges enteras de sus dedos? Si situamos este descubrimiento en su contexto, el síndrome aparece justamente publicado en 1964 (Lesh and Nyhan, 1964), es decir en plena ebullición de la relevancia que se da a la adenosina, la existencia de sus receptores y el efecto antagonista de la cafeína. No era difícil en el ambiente científico del momento pensar que era el exceso de bases púricas las que interferían y desplazaban a la adenosina de sus receptores, en este caso cerebrales. Si este razonamiento era válido, la inyección masiva y sostenida de cafeína a ratas debería de causar algún efecto. Efectivamente, el modelo de la rata se comportó como predicho en la hipótesis de partida, la rata se automutila, devorando sus extremidades, tanto más agudo cuanto mayor es la dosis y el tiempo de administración. Este modelo ha recibido muchos usos, pues se ha empleado también para evaluar comportamientos agresivos y test de aprendizaje. Lo que es bueno a dosis bajas es tóxico a dosis altas en el caso de la cafeína.

El origen del modelo de la cafeína como mimetizador de los síntomas de la enfermedad de Lesh-Nyhan, es difuso y aparece recogido en seminarios del tema sin un autor específico (Seminarios Lesh-Nyhan, 1968). En España el grupo del profesor Grisolia en Valencia realizó importantes contribuciones en el modelo de cafeína para tratar de comprender los déficits neurológicos (Miñana *et al.*, 1984; Portoles *et al.*, 1985). El modelo de ratón deficiente en el enzima, HGPRT, genéticamente modificado, conocido como KO, fue generado en 1993 (Wu and Melton, 1993), en este modelo se reproducían todos los síntomas de la enfermedad humana.

3.2. Primeras evidencias de los efectos extracelulares del ATP y otros compuestos purinérgicos en el sistema nervioso

Las acciones de los nucleótidos en las preparaciones neurales se realizaron más tardíamente que las del sistema cardiaco y circulatorio. La razón aparente era la mayor dificultad para disponer de un modelo animal sencillo y cuyos datos fueran reproducibles. Entre las primeras observaciones se encuentran las contracciones tetánicas producidas por inyección de ATP a los segmentos cervicales de la médula espinal de gatos (Buchthal *et al.*, 1947). Otro modelo fue la inyección directa de ATP a los ventrículos cerebrales que dio como resultado ataxia y debilidad muscular entre otros efectos, pero sin conseguir definir cuál era el receptor responsable y qué áreas eran las que respondían. Estos modelos de difícil interpretación dieron paso a preparaciones mucho más sencillas y útiles, como son las de la

unión neuromuscular. En esta preparación se reconoce el papel fisiológico del ATP demostrando que era capaz de potenciar la acción de la Acetilcolina sobre las contracciones del músculo esquelético (Buchthal & Folkow, 1948).

Es importante hacer aquí un pequeño paréntesis para comprender cuál era la situación sobre el conocimiento de la Acetilcolina (Ach), con respecto a la del ATP, ya que en aquella época había sido aceptada plenamente como neurotransmisor o señalizador en la placa motora. La acetilcolina se aísla en 1914 de extractos del cornezuelo de centeno, los alcaloides de este hongo parásito, *claviceps purpurea*, eran muy apreciados por sus propiedades hemostáticas y fueron de gran utilidad en la Primera Guerra Mundial (Dale, 1914). Posteriormente en 1926, Otto Loewi and Ernst Navratil en la Universidad de Graz (Austria), demuestran que la Ach era la sustancia que mediaba la neurotransmisión parasimpática en el modelo del corazón de rana (Loewi and Navratil, 1926 a, b). Este descubrimiento se produce seis años después de que Otto Loewi demostrara inequívocamente que la señalización del nervio al músculo en el corazón era mediada por la liberación de una sustancia química (Vagusstoff), cuya naturaleza estaba todavía por definir (Loewi, 1921).

Los anteriores descubrimientos abren de este modo a la investigación un nuevo paradigma que confirmaba la hipótesis de Ramón y Cajal, la necesidad de una sustancia química comunicando la neurona en la discontinuidad de la zona sináptica. En 1929 la Acetilcolina es aislada por primera vez de los tejidos animales (Dale and Dudley, 1929) y en 1936, Dale propone que es el neurotransmisor en la unión neuromuscular (Dale *et al.*, 1936). El principio postulado por Dale de *una neurona un transmisor*, sirvió para realizar avances en farmacología y fisiología al ofrecer una versión de la neurotransmisión más asequible a la experimentación, pero muy ingenua y simplista en su complejidad, siendo en buena parte culpable de retrasar el concepto de co-transmisión, ya que todos los neurotransmisores están almacenados en vesículas con muchas sustancias y a las cuales se les considera hoy día neurotransmisores de pleno derecho, o modulares de la señalización. Sin duda este fue el ambiente científico que se encontró el ATP y que influenció de modo negativo que se le considerara un neurotransmisor de pleno derecho en las mismas terminales.

3.3. Nuevos modelos animales para confirmar al ATP como neurotransmisor: Importancia del modelo de la estimulación antidrómica de los nervios sensitivos

La fuerte oposición a considerar el ATP como un neurotransmisor se prolongará durante muchos años, incluso cuando salen a la luz los originales y contundentes trabajos de Pamela Holton, quien utilizó modelos animales innovadores para el estudio de la señalización nerviosa. En sus trabajos, la selección de los modelos animales adecuados ha sido la clave del éxito, su objetivo era acceder a los lugares de liberación de sustancias por

los nervios sensitivos, para su posterior estudio. La primera selección fue el nervio auricular mayor que pertenece al plexo cervical, en conejos, ya que su oreja es extraordinariamente sensible y con vasos de gran calibre para recoger muestras después de la estimulación. Este nervio sensitivo se puede estimular desde la periferia llevando su información a la médula espinal, esta vía se denomina ortodrómica. Este modelo contaba con un serio problema, la enorme dificultad de recoger los compuestos liberados a nivel de las astas dorsales cervicales, sobre todo si se necesitaba mantener al animal vivo, por ello Pamela Holton estimuló desde la proximidad del ganglio dorsal hacia la periferia que es la vía denominada antidrómica, consiguiendo recoger en las terminales periféricas sensoriales una serie de compuestos, siendo el ATP el más abundante. Este modelo de estimulación antidrómica se ha puesto a punto en muchas especies y nervios diferentes, siempre estimulando desde la proximidad espinal y midiendo sensibilidad o respuestas en zonas periféricas. En su trabajo de 1954 demuestra claramente la liberación de ATP y utiliza una técnica absolutamente novedosa para la época, la de medir el nucleótido mediante bioluminiscencia con la luciferina/luciferasa de luciérnaga, para lo cual era necesario contar los eventos en un contador de centelleo como los utilizados en las medidas de radioactividad (Holton & Holton, 1954). El modesto insecto, conocido como luciérnaga, del orden de los coleópteros y nombre científico *Lampyris noctiluca*, ha sido una ayuda inestimable para realizar estudios de bioluminiscencia de gran sensibilidad, proporcionando el par luciferina/luciferasa, que en presencia de ATP emite luz.

3.4. Liberación conjunta de nucleótidos y otros neurotransmisores clásicos

Otro de los grandes descubrimientos de Pamela Holton (Holton, 1959) fue que la estimulación de los nervios simpáticos, cuyas terminales en el tejido liberan adrenalina, lo que ya era conocido, también liberan ATP a los espacios tisulares, esta fue la primera evidencia sólida para el concepto de co-transmisión que sería propuesto y consolidado por Geoffrey Burnstock más tardíamente (Burnstock, 1976).

El efecto de los nucleótidos y nucleósidos sobre la transmisión colinérgica fue demostrado más tardíamente. El principal obstáculo era el modelo de experimentación, hasta que se centraron en la unión neuromuscular. Uno de los primeros modelos fue el del estudio de señalización del nervio frénico que inerva el músculo del diafragma. En la rata en esta preparación se demostró por vez primera que la adenosina era capaz de reducir la liberación de acetilcolina (Ginsborg and Hirst, 1972). Los efectos del ATP sobre la neurotransmisión en la unión neuromuscular de rata y de rana fue un descubrimiento más tardío, pues fue necesario descartar los efectos de la adenosina y estar seguros de que el efecto se debía al nucleótido (Ribeiro and Walker, 1975). Este resultado es coincidente en el tiempo con el estudio del contenido de las vesículas obtenidas de las preparaciones de sinap-

tosomas de la unión neuromuscular, que aunque impuras indicaban que gran parte del ATP y de la acetilcolina pertenecían al contenido vesicular (Dowdall *et al.*, 1974).

Antes de estudiar los efectos de los compuestos purinérgicos sobre la señalización colinérgica, se produjo un descubrimiento fundamental en la comprensión de la neurotransmisión; lo realizó el grupo liderado por el profesor Katz en 1952 demostrando la naturaleza cuantal de la liberación de la acetilcolina en la unión neuromuscular (Fatt and Katz, 1952). Este descubrimiento abre las puertas a un nuevo paradigma, la necesaria compartimentalización de las zonas presinápticas, con existencia de reservorios donde almacenar los neurotransmisores antes de ser liberados. Varios grupos se lanzan al estudio del contenido vesicular de gránulos neurosecretores y neuroendocrinos, incluyendo las vesículas sinápticas de diferentes terminales nerviosas. Siendo el grupo del profesor Whittaker el que primero aísla las vesículas sinápticas del cerebro de mamíferos (Whittaker and Sheridan, 1964).

El estudio de las vesículas de secreción y su contenido demostraban claramente que el ATP y otros nucleótidos eran compañeros y estaban siempre co-almacenados con la acetilcolina, las catecolaminas, o la serotonina entre otros. A pesar de estas evidencias, el ATP y en general los nucleótidos seguían siendo considerados como meros estabilizadores del contenido interno granular.

4. CONTENIDO NUCLEOTÍDICO DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN, DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS NUCLEÓTIDOS: LOS DIADENOSINA POLIFOSFATOS APNA

En las neuronas y células de tejidos neuroendocrinos y secretores en general, es constante la presencia de vesículas y gránulos de almacenamiento, que son esenciales para liberar los neurotransmisores o las hormonas de manera controlada. El mecanismo es generalmente dependiente de calcio y se conoce como exocitosis.

La presencia de ATP y ADP en gránulos secretores se describió por primera vez en los gránulos cromafines de la médula adrenal, donde se encuentran almacenados junto con adrenalina y noradrenalina. La abundancia relativa de estas catecolaminas depende de la especie y de la distancia de las células a la corteza adrenal, las más próximas tienen adrenalina y las más alejadas, centrales a la glándula tienen mayor proporción de noradrenalina (Hillarp *et al.*, 1955; Blaschko *et al.*, 1956).

Empleando técnicas mucho más precisas y resolutivas, como la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), nuestro grupo descubrió, años más tarde en 1988, la presencia de los diadenosina polifosfatos, (ApnA, n= 4-6), siendo la primera vez que su presencia era descrita en organelas de almacenamiento de tejidos neurosecretores. Este descubrimiento merece ser relatado con cierto detalle.

4.1. Descubrimiento de los diadenosina polifosfatos en la Facultad de Veterinaria de la UCM

El descubrimiento de los diadenosina polifosfatos en los orgánulos de secreción lo realizamos en la Facultad de Veterinaria de la UCM, pidiendo prestado un HPLC, que generosamente nos facilitó el catedrático de Biofísica de la Universidad Autónoma de Madrid y profesor de investigación Roberto Parrilla, a quien desde aquí agradezco su generosidad. El equipo estaba en el Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, por aquel entonces todavía emplazado en la calle Velázquez. El material de partida eran las glándulas suprarrenales procedentes de los bóvidos sacrificados en los mataderos de Colmenar y de Legazpi, de donde aislábamos los gránulos cromafines. El becario postdoctoral que realizó los experimentos era Antonio Rodríguez del Castillo, procedente de la Universidad de La Laguna en la isla de Tenerife, quien realizaba su trabajo entre la facultad y el consejo

(Rodríguez del Castillo *et al.*, 1988). La presencia de GTP y GDP, así como la de otros muchos nucleótidos en cantidades prácticamente residuales eran también detectables en estas muestras. Los gránulos cromafines aislados de la médula adrenal de vaca o de buey fueron un excelente modelo, pues el tamaño de las glándulas permitía una fácil disección de la médula adrenal. Posteriormente, en otros modelos y tejidos secretores reproducimos el mismo patrón nucleotídico vesicular, gracias a los trabajos pioneros del Dr. Jesús Pintor en la Facultad de Veterinaria, los cuales constituyeron su Tesis Doctoral (Pintor *et al.*, 1992a, b, c).

Es obligado, llegados a este punto, dar las gracias a los veterinarios responsables del matadero de Colmenar y el de Legazpi, pues siempre cooperaron activamente en la recolección de las glándulas suprarrenales, que debían de ser obtenidas directamente del animal sacrificado, y rápidamente una vez cortado en canal, ya que se degradaban con extrema facilidad. Posteriormente el tejido diseccionado se homogeneizaba y del centrifugado en gradiente de densidad se aislaban los orgánulos para su estudio. Es muy importante señalar que la concentración de ATP en estos orgánulos puede alcanzar el 0.2 M y la de las catecolaminas hasta 0.55 M. Los diadenosina polifosfatos, Ap4A, Ap5A y Ap6A, están en concentraciones más reducidas, y pueden alcanzar hasta 5mM en el interior del gránulo.

Los compuestos coalmacenados son liberados conjuntamente al medio extracelular de forma exocitótica en presencia de calcio y pueden alcanzar en las proximidades de la zona de secreción concentraciones de mili y micro Molar para nucleótidos y dinucleótidos respectivamente (Pintor *et al.*, 1991a; 1992a; 1992c). El modelo de estudio fueron las glándulas adrenales de vaca o buey, canuladas y perfundidas con diferentes medios y agentes secretagogos. En ese modelo constatamos la presencia de nucleótidos y la de dinucleótidos en el perfundido. Estos últimos mostraban una mayor resistencia a la degradación.

Otro modelo de gránulos de almacenamiento bien conocido son los gránulos densos presentes en las plaquetas, donde se había descrito la presencia de serotonina que actúa como vasoconstrictor y hemostático en las roturas de vasos sanguíneos. La presencia de ATP, y sobre todo de ADP había sido descrita en los gránulos densos de las plaquetas y más tardíamente se descubren los diadenosina polifosfatos, todos ellos coalmacenados y liberados conjuntamente con la serotonina durante la agregación plaquetaria (Holmsen and Weiss, 1979; Lüthje and Ogilvie, 1983; Schlüter *et al.*, 1994). Aunque los estudios en las vías serotoninérgicas del sistema nervioso central no han abundado en la caracterización del contenido de sus vesículas sinápticas, es de suponer por analogía que se comportarán de modo similar.

Como modelo colinérgico el órgano eléctrico del pez *Torpedo Marmorata*, sirvió para caracterizar la placa motora más rica en elementos colinérgicos, ya que los nervios que inervan las membranas excitables contienen acetilcolina, en esta preparación el grupo del profesor Zimmermann descubrió que la acetilcolina está coalmacenada con ATP y que se liberaban conjuntamente cuando se producía una estimulación (Zimmermann and

Denston, 1976; Zimmermann, 1978). En esta misma preparación y en colaboración con el profesor Zimmermann, del Biocentrum de la Universidad de Frankfurt, realizamos una serie de experimentos en nuestros laboratorios de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Nuestro grupo consiguió analizar y demostrar que el contenido de las vesículas sinápticas del pez torpedo contienen una gran variedad de nucleótidos y que junto con el ATP y ADP, también se encontraban el GTP, GDP y los diadenosina polifosfatos, fundamentalmente Ap4A y Ap5A (Pintor *et al.*, 1992b). Para estos estudios contábamos con excelentes equipos de cromatografía de alta presión que habíamos adquirido gracias a los proyectos de investigación financiados por el Plan Nacional. Los peces torpedo, todavía vivos, nos los suministraba el profesor Carles Solsona, Catedrático de la Facultad de Medicina de Barcelona y procedentes del acuario de la misma ciudad, siendo procesados en la Facultad de Veterinaria de Madrid.

Todo el esfuerzo y trabajo experimental anteriormente reseñado sirvió para demostrar plenamente que los nucleótidos y dinucleótidos están almacenados con acetilcolina, catecolaminas, serotonina, histamina y otras hormonas peptídicas o proteicas en todos los modelos de almacenamiento vesicular en las diferentes especies estudiadas. Necesitamos ahora plantearnos como son los mecanismos de transporte al interior del gránulo y vesículas neurosecretores diversas, así como los mecanismos de su liberación.

4.2. Modelos de secreción de nucleótidos en animales vivos: perfusión cerebral y lágrimas

No sería lógico acabar este apartado sin reseñar que colaborando con el profesor Francisco Mora, a la sazón catedrático de fisiología de la facultad de Medicina de la UCM, tuvimos acceso a un modelo de experimentación animal extremadamente sofisticado: El de perfusión cerebral del animal canulado *in vivo*, mediante el sistema conocido como «Push-pull», que permite libertad de movimiento para el animal, en este caso ratas a las que se administra directamente en cerebro, o por otras vías, las sustancias objeto de estudio recogiendo directamente muestras del perfundido cerebral. De este modo analizábamos las respuestas del cerebro a diferentes sustancias: estimulantes, antidepresivos, antipsicóticos, etc... Cual no sería nuestra sorpresa cuando al administrar el estimulante anfetamina observamos la liberación al perfundido ventricular del cerebro de grandes cantidades de nucleótidos, sobre todo de Ap4A y Ap5A, confirmándonos su resistencia a la hidrólisis, mientras que el ATP, ADP son casi inexistentes, incrementándose sus productos de hidrólisis, el AMP y la adenosina. Esta liberación al perfundido cerebral era revertida por la presencia del antipsicótico y bloqueante de los receptores dopaminérgicos de amplio espectro que es el haloperidol (Pintor *et al.*, 1993 a y 1995).

La historia de los dinucleótidos de adenina, ApnA, no ha hecho más que empezar y con verdadera expectación asisto a los descubrimientos cruciales en el sistema visual realizados de modo continuado por el grupo del doctor

Jesús Pintor Just, Catedrático de Bioquímica en la Escuela Universitaria de Óptica, que han dado renovado valor a estos compuestos. Sus recientes trabajos de investigación han permitido conocer la presencia de los nucleótidos y sobre todo dinucleótidos en la secreción lacrimal y su papel en la re-epitelización corneal, la presión intraocular y su posible uso en el síndrome de ojo seco y en el de glaucoma (Carracedo *et al.*, 2010; Crooke *et al.*, 2008; Mediero *et al.*, 2008; Peral *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2005).

El modelo animal utilizado por el doctor Jesús Pintor en sus estudios ha sido fundamentalmente el de conejos, cuya secreción lacrimal es fácil de medir con el test de Schirmer. La lacrimación se estima insertando el extremo de una tira de papel de filtro en el saco conjuntival inferior, dejando el otro extremo colgando sobre el borde del párpado inferior. En este mismo modelo animal se pueden estudiar los efectos de diversas sustancias sobre la re-epitelización corneal. El procedimiento es una pequeña lesión corneal, realizada con un disco milimétrico impregnado con una sustancia agresiva, la velocidad de re-epitalización de la zona se mide por la reducción del diámetro de la lesión y se representa en función del tiempo. Los nucleótidos y los dinucleótidos han resultado ser muy eficaces en el tratamiento de este tipo de lesiones, acelerando la reparación corneal *in vivo*. Una actualización de la técnica que permite excluir el uso de animales ha sido puesta a punto por el doctor Pintor realizando cultivos de epitelio corneal de diversos animales, en donde es más fácil realizar un gran número de ensayos y sus correspondientes controles.

Es necesario señalar que de modo sorprendente, el mejor modelo de estudio para comprender el efecto de los nucleótidos en patologías oculares son los humanos, y la pequeña tira de papel absorbente, tipificado para el test de Schirmer, permite recoger la secreción lacrimal y medir mediante técnicas de Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, los niveles de los diferentes nucleótidos y dinucleótidos. Con este protocolo se han podido relacionar las diversas patologías oculares, irritación, ojo seco, síndrome de Sjögren, neuropatías del sistema nervioso autónomo, etc..., con los niveles de dinucleótidos y nucleótidos en la secreción lacrimal (Carracedo *et al.*, 2010; Crooke *et al.*, 2008; Mediero *et al.*, 2008; Peral *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2005).

5. TRANSPORTE DE NUCLEÓTIDOS AL INTERIOR DE LOS ORGÁNULOS DE SECRECIÓN: TRANSPORTADOR VESICULAR DE NUCLEÓTIDOS

La liberación de los compuestos neurotransmisores u hormonales al exterior de la célula requiere que estén almacenados en orgánulos discretos, como paso previo a su salida al responder la célula a estímulos excitadores. Los nucleótidos y otros neurotransmisores no peptídicos presentes en el interior de los gránulos necesitan unos eficientes sistemas de transporte, conocidos como transportadores vesiculares. Todos los transportadores vesiculares emplean el gradiente electroquímico de protones generado por una H^+ ATPasa vacuolar (V-ATPasa) para impulsar el transporte en contra del gradiente de concentración (Moriyama and Nelson, 1987; Forgac, 1999). Los gránulos neuroendocrinos y vesículas sinápticas han sido el modelo de elección para caracterizar los transportadores de neurotransmisores. Los primeros transportadores caracterizados fueron los de monoaminas, denominados así por su poca especificidad, ya que son capaces de internalizar dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina y otras aminas aromáticas, se designa con las siglas VMAT (Vesicular Monoamine Transporter) y han sido clonadas dos variantes el VMAT-1 y el VMAT-2, este último más abundante en cerebro. Con posterioridad se identificó el transportador vesicular de acetilcolina, conocido como VAT (Vesicular Acetylcholine Transporter) que también ha sido clonado y presenta la peculiaridad de que la secuencia del gen se encuentra dentro de uno de los intrones del enzima de síntesis de la acetilcolina, la colina acetiltransferasa, asegurando de este modo la expresión simultánea de las proteínas requeridas para la funcionalidad y especificidad de las neuronas colinérgicas (Bejanin *et al.*, 1994).

El transportador vesicular de monoaminas, al igual que el de acetilcolina, utiliza fundamentalmente el componente químico del gradiente de protones (ΔpH), denominado $\Delta \mu^{H^+}$. El transporte del neurotransmisor GABA y de los aminoácidos, glutamato y glicina, al interior de las vesículas secretoras, se realiza empleando fundamentalmente el componente eléctrico del gradiente de protones, conocido como $\Delta \psi$.

El transportador de aminoácidos inhibidores, GABA y glicina, conocido como VIAAT (Vesicular Inhibitory Aminoacid Transporter), reconoce a los dos compuestos con similar afinidad y fue clonado en 1998 (Sagné *et al.*, 1997).

Los transportadores vesiculares de glutamato, que definen el fenotipo glutamatérgico en neuronas, son el VGLT1, VGLUT2 y VGLUT 3, con

distribución muy diversa según las zonas del sistema nervioso. Curiosamente el transportador VGLUT1 había sido previamente caracterizado como una proteína de membrana plasmática capaz de transportar fosfato inorgánico, dependiente del gradiente de Na^+ (Bellocchio *et al.*, 2000).

Recientemente se ha producido un cambio de paradigma y es aceptado que los neurotransmisores clásicos se pueden comportar como co-transmisores. Esta idea ha salido reforzada cuando se demostró que los tres transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3) están presentes en las neuronas monoaminérgicas, colinérgicas y GABAérgicas centrales, así como obviamente en las neuronas primarias glutamatérgicas. Esta complejidad añadida plantea múltiples interrogantes sobre la organización funcional, con los dominios de localización preferente de ambos tipos de vesículas, y sobre todo comprender cuál es el significado fisiológico y funcional de este doble fenotipo neural (EL Mestikawy *et al.*, 2011).

El transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, es el que más interés tiene para este discurso y su caracterización ha sido muy compleja. El problema de partida es que el propio nucleótido transportado es además sustrato de la ATPasa vesicular, enzima presente en las membranas de los orgánulos de almacenamiento y necesaria para generar el gradiente electroquímico, indispensable para el transporte del propio nucleótido.

Con todas las limitaciones, dos fueron los modelos en donde el estudio resultó más exitoso: los gránulos cromafines de la médula suprarrenal bovina, que contienen también noradrenalina y adrenalina, y las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo Marmorata*, que contienen acetilcolina. En ambos modelos el transportador muestra baja especificidad y la dependencia de la componente eléctrica del gradiente de protones. La necesidad de emplear nucleótidos radioactivos y su rápido metabolismo en contacto con los gránulos, han sido siempre un obstáculo para la adecuada caracterización del transportador (Weber and Winkler, 1981; Luqmani, 1981; Bankston and Guidotti, 1996).

Una nueva metodología desarrollada enteramente en nuestro laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la UCM, ha permitido comprender desde el punto de vista cinético el comportamiento de los transportadores de nucleótidos. Esta técnica se basa en la utilización de análogos fluorescentes del ATP, el eteno-ATP (1,N⁶-etenoadenosina trifosfato). El análisis de los nucleótidos transportados al interior granular se efectuó mediante técnicas de HPLC y detección mediante fluorescencia de los nucleótidos en el eluido cromatográfico. Esta técnica permitió demostrar que los transportadores de nucleótidos presentan una compleja cinética de saturación, la cual por su analogía con los enzimas histeréticos hemos denominado transporte mnemónico (Ricard *et al.*, 1977; Ricard and Cornish-Bowden, 1987). Este tipo de cinética permite cambios muy acusados en la afinidad por el sustrato para adaptarse al estado energético de la célula, actuando solamente cuando los niveles de ATP intracelulares son muy altos (Gualix *et al.*, 1996).

El estudio del transporte de nucleótidos mediante citometría de flujo fue otra de las técnicas desarrolladas en nuestro laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la UCM. La aplicación de esta técnica fue posible al

utilizar nucleótidos fluorescentes como sustrato y orgánulos subcelulares de un tamaño no inferior a los gránulos cromafines, lo que nos ha permitido utilizar la citometría de flujo para estudiar la cinética de los transportadores de orgánulos subcelulares. La técnica fue puesta a punto por Javier Gualix con los gránulos cromafines de médula adrenal bovina cuyo diámetro medio es de $4.9\ \mu\text{m}$ (Warashina, 1985), abriendo enormes expectativas de futuro y estos estudios pertenecen a su tesis doctoral (Gualix *et al.*, 1999a). Otra ventaja de la técnica fluorescente, acoplada a HPLC, ha sido disponer de la suficiente sensibilidad para poder medir el transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas aisladas de cerebro. Los resultados demostraron la gran analogía existente entre las vesículas de tamaño pequeño y los grandes orgánulos de almacenamiento, ambos con la misma afinidad para los nucleótidos y el mismo perfil de saturación mnemónico (Gualix *et al.*, 1999b).

La combinación de las técnicas de fluorescencia y de cromatografía líquida de alta resolución, nos permitió caracterizar el transportador presente en los gránulos secretores de la médula suprarrenal, mostrando afinidades muy elevadas, $10\text{-}20\ \mu\text{M}$ para los diadenosina polifosfatos, sustancias que son señales de estrés en el interior de la célula. Además, estudios de competición por sustrato demostraron que el transporte de los diadenosina polifosfatos se efectúa a través del transportador de nucleótidos, y solo un comportamiento mnemónico permite explicar las oscilaciones de afinidad necesarias para efectuar ambas tareas (Gualix *et al.*, 1997).

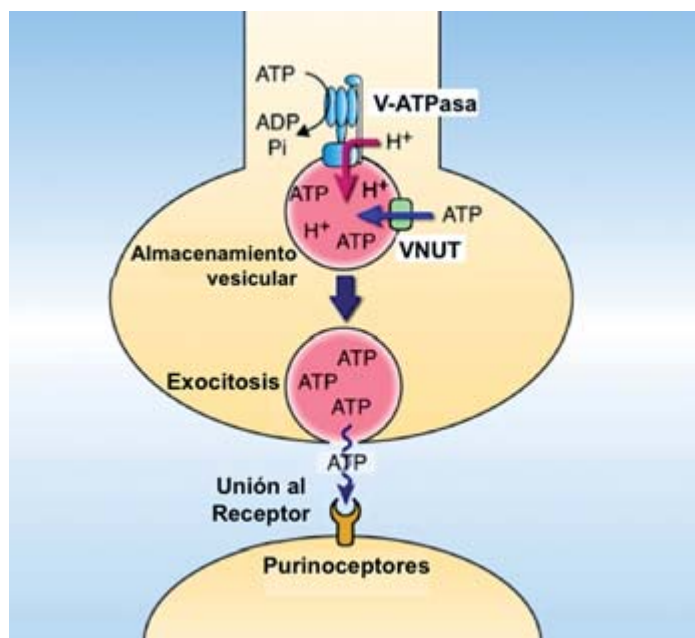


FIGURA 1. Transporte de nucleótidos al interior de los gránulos de almacenamiento: Necesidad de un gradiente energético generado por la V-ATPasa y de un transportador específico, el VNUT. Modificado de Sawada *et al.*, 2008.

5.1. Caracterización molecular del transportador de nucleótidos VNUT (SLC17A9) y su filogenia

La caracterización molecular del transportador vesicular de nucleótidos, conocido como VNUT, se resistió duramente a ser descubierto y fue necesario esperar hasta que el grupo de Moriyama en Japón lo identificara como el producto proteico codificado por el gen SLC17A9, presente tanto en humanos como en ratón. El gen es un nuevo miembro de la familia de transportadores aniónicos y se expresa abundantemente en cerebro y en glándula adrenal, en donde, como no podía ser de otro modo, está localizado en los gránulos cromafines. Neuronas en cultivo de tipo N2a, procedentes de una línea tumoral, también expresan abundantemente el transportador y liberan ATP por exocitosis al ser estimuladas. Aspectos estudiados con detalle y alta tecnología de TIRF (Total Internal Reflection Microscopy) por el grupo del Profesor Antonio Rodríguez Artalejo en la facultad de Veterinaria de la UCM (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2011). La supresión de la expresión del gen endógeno, mediante RNA de interferencia reduce la incorporación de ATP a los gránulos y la disminución de la liberación de ATP por exocitosis (Sawada *et al.*, 2008). Posteriormente se ha estudiado en profundidad la distribución en cerebro y en otras glándulas secretoras del transportador vesicular de nucleótidos conocido como VNUT, mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Larsson *et al.*, 2011).

He introducido en el párrafo anterior la nomenclatura del gen del VNUT, como SLC17A9, lo que me obliga a plantear el origen de tal denominación. La abundancia de transportadores de sustancias disueltas en el medio celular y extracelular, SLC (solute carriers) y su dispar nomenclatura obligó establecer unas reglas para definir los genes y sus familias de modo racional basados en analogía de secuencias.

Actualmente disponemos de unos 1.000 genomas secuenciados entre bacterias, *archaea* y eucariotas y en ellos se ha rastreado la presencia de proteínas transportadoras de sustancias en disolución, las SLC. El análisis comparativo de secuencias demostró la abundancia de este tipo de proteínas cuya localización era tanto la membrana plasmática como las membranas de los orgánulos intracelulares. El conocimiento de las secuencias permitió además establecer los dendrogramas y organizar en familias y subfamilias los correspondientes genes, dando información de su origen evolutivo e incorporar a los nuevos miembros pendientes de ser descubiertos (Saier, 1999).

Aproximadamente unas 5.000 secuencias de SLC diferentes han sido identificadas en las 17 especies animales que se han comparado. En el genoma humano los transportadores de membrana, SLC, son muy abundantes y se han agrupado en 46 familias. Sorprende que de las 46 familias que como hemos mencionado se encuentran en el genoma humano, 43 de ellas se encuentran también en el gusano *Caenorhabditis elegans* y 42 en el genoma de insectos. El gran número de genes que en humanos integran estas familias, formando subfamilias, refleja sin duda el relevante papel que estas proteínas tienen a nivel del sistema nervioso central y tejidos secretores.

Desde el punto de vista evolutivo, estos genes SLC presentan familias divergentes antes de la aparición de los animales con simetría bilateral, los *bilateria* (Höglund *et al.*, 2011). Sin duda la compartimentalización con membranas lipídicas para proteger el interior celular y su metabolismo, así como establecer diferentes compartimentos funcionales han forzado la comunicación mediada por proteínas capaces de transportar los diversos productos necesarios para todas las funciones vitales: nutricionales, señalizadores, metabólicos, nocivos, etc..., y necesariamente tuvo que aparecer con los primeros seres vivos compartimentalizados.

Respecto a la familia SLC17, es importante reseñar que también contiene los transportadores vesiculares de aminoácidos, como el glutámico y aspártico. Existen en esta familia cuatro grupos filogenéticos principales que aparecen antes de la divergencia del linaje de los insectos. El SLC17A9, es el gen del transportador VNUT en humanos y mediante técnicas de hibridación *in situ* con una sonda fluorescente antisentido, se pudo observar que en cerebro se expresa abundantemente en el cortex cerebral, zonas específicas del hipocampo, tálamo e hipotálamo. Algunas de las regiones con mayor presencia son el núcleo de la habénula y el giro dentado del hipocampo, en los cuales la señalización purinérgica es muy abundante (Sreedharan *et al.*, 2010).

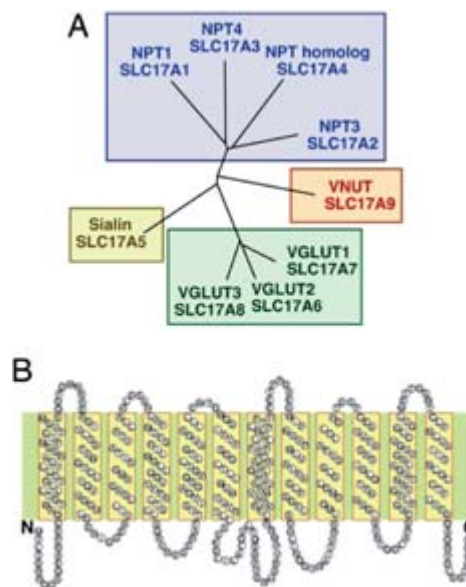


FIGURA 2. **Árbol filogenético de la familia SLC17.** A. La familia SLC17 está constituida por cuatro grupos principales: el que transporta fosfato en la membrana plasmática, el que transporta glutamato a las vesículas de secreción, el que transporta ácidos sialicos en la membrana plasmática y, finalmente, el transportador vesicular de nucleótidos. B. Topología general de las proteínas de la familia SLC17 en la membrana, deducida mediante secuencia de la proteína generada a partir del SLC17A9, que es el VNUT. Modificado de Sawada *et al.*, 2008.

5.2. Liberación de ATP al medio extracelular: Exocitosis *versus* No-exocitosis

El almacenamiento vesicular y la presencia de VNUT en los tejidos neurales y secretores han cerrado el círculo de los requerimientos para la salida exocitótica de ATP. Este tipo de liberación vesicular requiere una señal desencadenante, despolarización celular y entrada de calcio al citosol. No entraré a comentar los mecanismos moleculares del proceso exocitótico, pues es un proceso complejo, que nos alejaría del verdadero interés de este trabajo. Lo que sí ha resultado novedoso es que sea el ATP el que a través de sus receptores ionotrópicos P2X el que induce la exocitosis de los propios nucleótidos almacenados en vesículas. La secuencia completa de eventos ha sido analizada en una línea celular, la de neuroblastoma N2a. El ATP es capaz de activar el receptor P2X7 presente en la membrana plasmática de la neurona. El receptor P2X7 es un canal operado por ligando que en presencia del agonista abre la compuerta para el ion Ca^{2+} . El ion calcio es el que media en la exocitosis vesicular permitiendo la fusión de las organelas y produce un incremento de la superficie de membrana que se mide por alta resolución de la capacitancia de la célula, que se incrementa al estimular con el agonista P2X7. En las mismas células, mediante la técnica de TIRF (Total Internal Reflection Microscopy), marcando las vesículas con colorantes fluorescentes, se puede seguir el movimiento vesicular, y el posterior anclaje a la membrana previo a la salida exocitótica del neurotransmisor, que puede ser medida mediante técnicas luminiscentes con luciferina. El ATP liberado produce además una onda de ATP que induce la señalización en otras neuronas y el estímulo puede ser bloqueado con el antagonista del P2X7, conocido como BBG. Todo este proceso puede ser bloqueado con inhibidores de la salida exocitótica, como son el compuesto N-etilmaleinimida, bloqueante de grupos SH en proteínas esenciales para la exocitosis y por la toxina botulínica, que fue una donación del Profesor Thomas Binz del Institut für Biochemie, Medizinische Hochschule de la Universidad de Hannover, Germany. Este trabajo realizado en la Facultad de Veterinaria de la UCM en colaboración con el catedrático de Farmacología don Antonio Rodríguez Artalejo demostraba claramente la salida exocitótica del ATP, y su papel extracelular (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2011). Pensamos que en los tejidos neurales y neuroendocrinos la salida exocitótica controlada es la más importante y que en los espacios sinápticos es la única, o la mayoritaria, pero hay otros tejidos en donde la presencia extracelular del ATP no puede explicarse sin acudir a otras vías.

En los apartados anteriores he hecho especial mención al ATP, pero existen otros muchos nucleótidos y algunos de ellos no detectados en vesículas hasta la fecha y para los cuales se conoce una función señalizadora mediada por receptores específicos. Este es el caso para los nucleótidos de uridina, UTP, UDP, y la serie de azúcares activos. UDP-glucosa, UDP-manosa, etc., cuya función en el Golgi es participar en el proceso de glicosilación de las proteínas. Para estos compuestos el grupo del profesor Eduardo Lazarowsky y el profesor Richard Boucher en la Universidad de

North Carolina en Chapel Hill han propuesto que su salida está mediada por la exocitosis constitutiva como excedente de la actividad del Golgi (Lazarowski, 2006; Lazarowski *et al.*, 2011).

Los mecanismos de liberación de los nucleótidos de purinas y pirimidinas al exterior de la célula no mediada por exocitosis regulada, es un área de debate y la caracterización de las proteínas de membrana capaces de mediar en este proceso es un fértil campo de investigación que aportará nuevas ideas a la señalización extracelular mediada por nucleótidos.

6. PRIMERA CLASIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS Y SUS MODELOS DE ESTUDIO: RECEPTORES P1 Y P2

En 1978 el profesor Geoffrey Burnstock, después de un exhaustivo estudio, propuso la subdivisión de los receptores purinérgicos en P1 los que respondían a adenosina y eran antagonizados por metilxantinas, como la cafeína y la teofilina, y los P2 que respondían a nucleótidos. Los receptores P1 posteriormente recibieron el nombre de receptores de adenosina, receptores tipo A, ya que entre todas las bases púricas y pirimidínicas y sus respectivos nucleósidos ninguno de ellos presentaba efectos agonistas significativos. En sus inicios, los efectos de la adenosina fueron estudiados midiendo cambios en la actividad del enzima de membrana Adenilato ciclase, mientras que los nucleótidos en los primeros estudios no parecían afectar a este enzima (Burnstock, 1978). El resultado era un cambio notable en los niveles de AMP cíclico cuando se estimulaba con adenosina y sin cambios significativos si se empleaban nucleótidos. Para estudiar los efectos diferenciales de adenosina y nucleótidos sobre cascadas de señalización, fue necesario buscar modelos celulares resolutivos y diferenciales. Tarea difícil teniendo en cuenta la ubicuidad de ambos tipos de receptores. Entre los primeros modelos celulares están los adipocitos que sirvieron para establecer claramente la presencia de un receptor de adenosina capaz de inhibir, sin duda alguna, la adenilato ciclase, ya que como resultado al final de la cascada se inhibía la triglicérido lipasa y se ralentizaba el metabolismo de los lípidos almacenados. La cafeína resultó ser un compuesto esencial en estos estudios, ya que se demostró que era un antagonista eficaz de los receptores de adenosina. Al actuar como antagonista de los receptores de adenosina que están acoplados a las proteínas Gi, favorecía cualquier estímulo activador del enzima adenilato ciclase, como los mediados por noradrenalina o adrenalina. En el modelo de los adipocitos este efecto resultaba en una activación de la triglicérido lipasa, consiguiendo un eficiente catabolismo de los lípidos acumulados en la célula. Esta es la razón por la que la cafeína es un componente eficaz y muy utilizado en las cremas de adelgazamiento locales, que tanto éxito tienen para su uso en dermofarmacia y cosmética.

Quiero hacer en este apartado una mención especial al Dr. Madinaveitia quien en época tan temprana como 1949, mucho antes de que se propusiera la existencia de receptores de adenosina, publicó una serie de artículos de gran interés y trascendencia en el tratamiento de enfermedades infecciosas y por el interés que tiene en este apartado cito uno cuyo título es «Antima-

larial compounds as antagonists of adenosine». Dejo el título en su original inglés, pues está publicado en el British Journal of Pharmacology and Chemotherapy (Madinaveitia and Raventos, 1949). Sirvan estas escasas líneas como testimonio para que su esfuerzo en una época tan difícil no caiga en el olvido.

6.1. Receptores de Adenosina, AR (P1) y sus modelos de estudio

Antes incluso de la separación entre receptores de Adenosina y de nucleótidos, existían evidencias de que los receptores de Adenosina no pertenecían a una población homogénea. En efecto, mientras que en los adipocitos de rata la adenosina reducía los niveles de AMPc, en cortes de diferentes áreas de cerebro de rata, por el contrario incrementaba los niveles de AMPc (van Calker *et al.*, 1978, 1979; Londos *et al.*, 1978; 1980).

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado cuatro tipos de receptores específicos de adenosina, denominados inicialmente receptores P1. Actualmente se los conoce como: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, todos ellos acoplados a proteínas G de la familia de las siete hélices transmembranares. Estos cuatro receptores están estrechamente relacionados y constituyen un ejemplo destacado de miembros de una familia que son todos ellos activados por un único agonista endógeno, la adenosina. En estos casos, la distribución tisular suele ser un elemento clave en su función fisiológica y si coexisten en la misma célula la distribución topográfica y las cascadas de señalización definirán la respuesta celular. Existen varios agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptor que se muestran en la Tabla 2 (Burnstock, 2007, a, b). Estos receptores pueden mediar diversos efectos fisiológicos como modulación del sistema cardiovascular, sistema inmune y sistema nervioso. Nuestro grupo en la Facultad de Veterinaria de la UCM demostró que la activación de los receptores presinápticos de adenosina modula la respuesta a nucleótidos y dinucleótidos en terminales nerviosos de cerebro de rata, actuando sobre receptores P2X₁ y P2X₃. Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral del Profesor Miguel Díaz-Hernández (Díaz-Hernández *et al.*, 2002).

Las acciones vasculares de la adenosina ha sido uno de los campos más fértiles de investigación e indisolublemente asociados al progreso en las patologías cardiovasculares. Al disponer actualmente de buenos agonistas y antagonistas es más fácil la asignación de propiedades a sus receptores específicos. En nuestro país hay excelentes grupos trabajando en este campo y con modelos de extrema delicadeza, entre ellos el grupo del profesor Albino García-Sacristán, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Veterinaria primero, y después de la de Farmacia de la UCM. Sus estudios sobre la acción de la adenosina sobre los vasos de pequeño diámetro, como las arterias peneanas y las coronarias de pequeño diámetro, son un referente bibliográfico obligado (Ribeiro *et al.*, 2011; Simonsen *et al.*, 1997).

Actualmente y sobre todo teniendo en cuenta la importancia de la adenosina en las funciones cerebrales, cardiacas, inflamatorias o del sistema

TABLA 1. **Clasificación de los receptores de adenosina.**
 Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Burnstock, 2007; Fredholm, 2001

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
A ₁	CCPA, CPA S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-08040 MRS1754, WRC- 0571	G _{i/o} ↓AMPc ↑IP ₃	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón, terminales nerviosas autónomas
A _{2A}	CGS 21680 HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261 ZM241385, K2 6002	G _s ↑AMPc	Cerebro, corazón, pulmón, bazo
A _{2B}	NECA (no selectivo)	Enprofilina, MRE2029-F20 MRS17541, MRS 1706	G _s ↑AMPc G _{Q/11} ↑IP ₃	Intestino grueso, vejiga
A ₃	IB-MECA, 2- CI-IB-MECA DBXRM, VT160	MRS 1220, L-268605 MRS 1191, MRS 1523 VUF8504	G _{i/o} G _{Q/11} ↓AMPc ↑IP ₃	Pulmón, hígado, cerebro, testículos, corazón

inmune, se necesitan agonistas y antagonistas específicos. Hasta hace relativamente poco tiempo el único compuesto aceptado para su utilización en humanos era la cafeína, que antagoniza todos los subtipos de receptores AR. Un excepcional artículo de revisión sobre los efectos de la cafeína ha sido publicado por el profesor Bertil Fredholm del Instituto Karolinska (Fredholm, 2003). La carencia de selectividad de la cafeína ha impedido su empleo como antagonista para diferenciar los subtipos de los receptores de adenosina implicados en determinadas patologías. Estos últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable para sintetizar agonistas y antagonistas específicos de los subtipos de receptores de adenosina y su utilización en humanos (Jacobson, 2009). La aprobación por la FDA en el año 2008 de un agonista selectivo del receptor A_{2A} para su uso como vasodilatador coronario en los ensayos de perfusión miocárdica, conocido con el nombre comercial de *regadenoson*, ha supuesto un antes y un después en la farmacología de los receptores de adenosina (Trochu *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2011). El conocimiento de la estructura del receptor A_{2A}, cristalizado conjuntamente con el antagonista (PDB código: EML) ha proporcionado detalles de la interacción del receptor y el ligando a niveles de resolución atómica y proporciona el molde más preciso para realizar diseños y selección de fármacos (Lane *et al.*, 2011).

6.2. Importancia de los ratones genéticamente modificados para comprender el papel fisiológico de los receptores de adenosina

Los modelos animales han sido esenciales para comprender el efecto de agonistas y antagonistas que ha proporcionado la química farmacéutica. Actualmente se complementan con la disponibilidad de animales donde se sobreexpresa o se anula el gen, los conocidos como animales genéticamente modificados *knock-in* y *knock-out*.

Los receptores A_1 están ampliamente distribuidos por todo el cerebro, mientras que los A_{2A} son más abundantes en los ganglios basales, aunque su presencia ha sido demostrada en cortex cerebral e hipocampo. El bloqueo o disrupción genética del receptor A_{2A} confiere una profunda neuroprotección en los ratones adultos en modelos de isquemia experimental, mientras que en los animales jóvenes con cerebro inmaduro la ausencia del A_{2A} lleva a efectos opuestos, con poca neuroprotección y escasa capacidad de respuesta en los modelos de isquemia. Un trabajo muy interesante y completo sobre el empleo de ratones con receptores de adenosina modificados es el realizado por el Dr. Yang en su tesis leída en 2008 en el Instituto Karolinska y dirigida por el profesor Bertil Fredholm.

La sobreexpresión o eliminación de los receptores A_1 y A_{2A} en ratones muestra pocas adaptaciones compensatorias de otros receptores, lo cual facilita la interpretación de los datos y de las acciones fisiológicas específicas. Los efectos cardioprotectores del receptor A_1 quedaron plenamente confirmados, aumentando con la sobreexpresión y reducidos por el *knock out*.

Los efectos locomotores de la cafeína, relacionados con el nerviosismo de los humanos, son ejercidos sobre los receptores A_1 y A_{2A} . En animales con el receptor A_1 bloqueado, el efecto de la cafeína se reduce ligeramente, pero en receptores donde falta el A_{2A} esta acción se reduce casi totalmente. Se demostró así que los efectos de la cafeína sobre la locomoción son mediados fundamentalmente por el receptor A_{2A} . Ambos receptores A_1 y A_{2A} contribuyen al desarrollo de la tolerancia a la cafeína, incrementándose sus niveles con la ingesta repetida de esta base xántica (Lankford *et al.*, 2006).

6.3. Aspectos nutricionales en el desarrollo fetal en relación con los receptores de adenosina

Relacionado con estos resultados está el nuevo modelo de estudio desarrollado por la profesora Mairena Martín, Catedrática de Bioquímica en la Universidad de Castilla-La Mancha, quien demostró que la ingesta prolongada de cafeína en la dieta en ratas gestantes, o durante la lactación regula negativamente la expresión de los receptores de adenosina tipo A_1 tanto en los cerebros de la madre como en los de los animales neonatos (Lorenzo *et al.*, 2010). Estos resultados han sido también demostrados en el modelo de ratón hembra gestante, con el dato añadido de profundos

cambios de comportamiento en las crías de ratón cuando alcanzan la edad adulta (Björklund *et al.*, 2008).

El modelo de ratas gestantes ha permitido igualmente demostrar los efectos de la ingesta elevada de glutamato monosódico, aditivo alimentario que se emplea profusamente. Este compuesto fue primero utilizado por los japoneses que le dieron la denominación de Aji-no-moto, como nombre comercial, aunque es más conocido como E621. Durante la gestación y la lactancia se debe limitar la ingesta de este aditivo, ya que en el modelo de la rata disminuye la presencia de receptores A_1 tanto en la madre como en los neonatos y por el contrario existe un notable incremento de la expresión de los receptores A_{2A} , haciendo al individuo más propenso a problemas de comportamiento irritable (López-Zapata *et al.*, 2011). Estos resultados nos permiten también comprender como los diferentes receptores establecen un diálogo que permite armonizar las actividades de las células. Es importante señalar que se ha demostrado claramente la formación de heterodímeros, o heteromultímeros para los receptores de Adenosina con otros receptores, como los de dopamina, glutamato, etc., abriendo posibilidades insospechadas para la síntesis de fármacos con acción dual (Ciruela *et al.*, 2011).

El receptor A_3 es el menos conocido y menos abundante de los receptores de adenosina, el modelo de ratón en el cual se ha bloqueado la expresión del receptor A_3 presenta un fenotipo muy marcado y sorprendente, que es la disminución de la temperatura corporal y del latido cardíaco, así como incremento en la ingesta calórica, aunque no presenta incremento del peso corporal respecto al ratón silvestre.

7. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR: RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS P2

La primera clasificación de los receptores purinérgicos estableciendo una clara diferencia entre los sensibles a nucleósidos y los sensibles a nucleótidos fue propuesta por Burnstock en 1978. Pronto se observó que existía una gran heterogeneidad entre las respuestas a ATP dependiendo de los modelos de estudio. El escaso arsenal farmacológico de los análogos de ATP, como agonistas, y la carencia de antagonistas, dilataron la caracterización de los receptores y por lo tanto de su clasificación. Finalmente en 1985, Burnstock y Kennedy propusieron la primera subdivisión clara de los receptores de nucleótidos, conocidos como receptores P2 en dos familias P2X y P2Y (Burnstock & Kennedy, 1985). El modelo claro de presencia de receptores P2X lo proporcionaba la vasoconstricción y contracción del músculo liso visceral, utilizando un agonista escasamente hidrolizable, el α,β -meATP, el modelo claro de P2Y, era el de vasodilatación y relajación del músculo liso del estómago, utilizando el agonista 2-metilatioATP (2-MeATP).

Otros subtipos de receptores fueron propuestos de modo casi inmediato, como el P2T, receptor específico para el ADP presente en plaquetas y trombocitos, actualmente conocido como P2Y₁₂ (Gordon, 1986). Otro receptor propuesto fue el P2Z, presente en macrófagos, linfocitos y mastocitos, cuyo agonista principal era el ATP, en ausencia de magnesio. Actualmente a este receptor se le conoce con el nombre de P2X₇ y ha sido el último de la familia de los P2X en ser clonado. El receptor P2U se propuso como específico para los nucleótidos de uridina, hoy día se encuentran englobados en la familia P2Y y hay varios subtipos (P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆) (O'Connor *et al.*, 1991). Un receptor propuesto y de especial relevancia para nuestro grupo ha sido el P2D, pues sus agonistas específicos eran los dinucleótidos descubiertos por nuestro grupo (Pintor & Miras-Portugal, 1995). Actualmente y gracias al trabajo de nuestro grupo sabemos que estos compuestos actúan sobre los receptores denominados P2X₁ y P2X₃, que son ionotrópicos y otros miembros de la familia P2Y.

Actualmente los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio & Burnstock, 1994). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado

y caracterizado farmacológicamente siete subunidades diferentes que constituyen los receptores P2X (P2X₁-P2X₇) y ocho subunidades P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) (Burnstock, 2007). La nomenclatura empleada en este discurso tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge *et al.*, 2009).

La identificación y caracterización farmacológica de los receptores P2 no es tarea sencilla. La falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar bien los distintos subtipos hace que se produzca solapamiento de las respuestas obtenidas en sistemas que co-expresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes pueden degradar o transformar los compuestos utilizados. Por lo tanto, aunque haya sido posible encontrar en los tejidos nativos receptores análogos a algunos de los receptores P2 clonados (coincidiendo en la distribución, mecanismos de señalización y farmacología), en la mayoría de los casos no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón «-like» («P2X₁-like», «P2Y₂-like», etc.) hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

7.1. Receptores P2Y y su descubrimiento, relevancia de las técnicas de biología molecular

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A. En general responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas. Poseen siete segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, el extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular.

La familia P2Y consta de ocho subtipos clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007).

El primer receptor identificado mediante técnicas de biología molecular fue el P2Y₁ y lo clonó de cerebro de pollo en su fase embrionaria, el grupo del profesor Eric Barnard de la Universidad de Cambridge, Reino Unido. Utilizó para ello una librería de cDNA que analizó mediante ensayos de hibridación en condiciones de baja calidad de reconocimiento con el receptor beta-adrenérgico, se aislaron múltiples candidatos y finalmente se identificó uno de los RNAm. La proteína codificada contiene 362 aminoácidos (41 kDa) y mostraba escasa homología de secuencia con cualquier otro receptor acoplado a proteínas G conocido hasta aquel momento, con un máximo de 27% de homología (Webb *et al.*, 1993). La expresión del RNA complementario en ovocitos de *Xenopus*, mostró claramente respuestas al nucleótido ATP. Como ironía del destino, señalar que el ATP es un agonista parcial y que el verdadero agonista del receptor P2Y₁ es el ADP, que induce la respuesta máxima.

El segundo receptor clonado fue el P2Y₂, al que inicialmente se denominó P2U, ya que respondía tanto a nucleótidos de adenina como a nucleótidos de uridina, como el UTP. Lo clonó el grupo de David Julius de una librería de cDNA de ratón, demostrando que estaba presente en muchos tejidos, tanto neurales como no neurales y sobre todo en los endotelios vasculares. El receptor clonado, una vez expresado en ovocitos de *Xenopus*, era activado de modo equivalente por ATP y por UTP, induciendo la movilización intracelular de calcio de los reservorios intracelulares y sus propiedades coincidían con el receptor denominado P2U. A partir de ese momento el receptor se denomina P2Y₂ (Lustig *et al.*, 1993).

7.2. Aspectos singulares del receptor P2Y₁₂ plaquetario y la farmacología antitrombótica

Cada uno de los receptores clonados, además del P2Y₁ y del P2Y₂, tiene su propia historia, por ello solo haré mención de uno más, el receptor P2Y₁₂, ya que durante mucho tiempo fue un enigma. Coinciden en la identificación molecular del P2Y₁₂ el descubrimiento de la primera enfermedad hereditaria asociada a un receptor P2Y, y la asignación de la diana farmacológica a un fármaco utilizado durante muchos años contra el ictus cerebral y las etapas postinfarto como antiagregante plaquetario, me refiero al clopidogrel (Plavix).

La identificación del receptor plaquetario de ADP, como diana de los nuevos fármacos antitrombóticos abrió una nueva era en farmacología (Hollpeter *et al.*, 2001). El laboratorio donde se realizaron los estudios es el de David Julius en el Departamento de Farmacología Molecular y Celular de la Universidad de California en San Francisco. Hacer mención que David Julius, junto con Linda Watkins y Baruch Minke, recibió el Premio Príncipe de Asturias de la Ciencia por sus investigaciones sobre el dolor en 2010.

El modelo de investigación donde se identificó el receptor P2Y₁₂, fueron las plaquetas humanas que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis sanguínea y en donde anomalías en su actuación pueden llevar a la formación de trombos con oclusión vascular. El ADP liberado de los tejidos dañados y de los glóbulos rojos induce la agregación plaquetaria mediante la activación de la integrina GPIIb-IIIa y la subsecuente unión al fibrinógeno. Las plaquetas una vez activadas también secretan ADP de sus gránulos densos originando un sistema de retroalimentación (feed-back) que potencia la acción de otros activadores plaquetarios. El ADP interviene en la agregación plaquetaria mediante dos subtipos de receptores acoplados a proteínas G. El P2Y₁, que está acoplado a la proteína G_q y moviliza el calcio intracelular necesario para cambiar la forma de las plaquetas e inducir agregación. El segundo receptor de ADP necesario para la agregación es el P2Y₁₂ y está acoplado a la proteína G_i que media en la inhibición de la adenilato ciclasa y permite la reorganización del citoesqueleto de actina, reduciendo los niveles de AMPc. Este receptor resultó ser la diana para los fármacos antitrombóticos, tales como la ticlo-

TABLA 2. **Clasificación de los receptores P2Y.**
Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Abbracchio, 2003; Burnstock, 2007; Moore, 2001; King, 2003; von Kugelgen, 2006; von Kugelgen, 2000.

Receptor	Potencia de agonistas (EC ₅₀)	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y ₁	2MeSADP>ADPβS>2MeSATP=ADP >ATP UTP, UDP inactivos Ap ₃ A>Ap ₂ A	MRS 2279>MRS 2179> Suramina>PPADS	G _i /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, músculo esquelético, tracto digestivo, células gliales, osteoclastos
P2Y ₂	ATP=UTP>Ap ₃ A ADP, UDP y 2Me SATP inactivos	Suramina>Azul reactivo 2, ARC126313	G _i /G ₁₁ ; G ₁₀ ; G ₁₂ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Músculo esquelético, epitelio respiratorio, hueso, pulmón, pituitaria, endotelio de microvasculatura coronaria, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón
P2Y ₄	UTP>UTPγS>>ATP, UDP (agonistas parciales) UTP=ATP=Ap ₃ A(rata)	PPADS Azul reactivo 2 (rata)>Suramina	G _i /G ₁₁ ; G ₁₀ ; G ₁₂ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Intestino, cerebro, pituitaria, placenta, corazón, pulmón, músculo liso vascular, células endoteliales
P2Y ₆	UDPβS>UDP>UTP>ADP>2MeSATP	Azul reactivo 2 >PPADS>Suramina, MRS2578	G _i /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Placenta, bazo, riñón, corazón, aorta, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y ₁₁	ATPγS=BzATP>ATP>2MeSATP	Suramina > Azul reactivo 2, NF157, 5'-AMPs	G _i /G ₁₁ y Gs PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Activación AC	Cerebro, placenta, pituitaria, intestino, sistema inmune, granulocitos
P2Y ₁₂	2MeSADP=2MeSATP>>ADP>>ATP UTP, UDP inactivos	AR-C6931, AR-C66096, Clopidogrel, Ticlopidina, Azul reactivo 2, Suramina, 2Me SAMP, CT50547, AZD6140, INS49266, PSB0413, PPADS inactivo, BzATP (rata)	Gi Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro
P2Y ₁₃	2MeSADP=2MeSATP>ADP>>ATP UTP, UDP inactivos	AR-C6931>PPADS>Suramina 2Me SAMP MRS2211	G ₁₀ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Inhibición AC Activación RhoA	Bazo, cerebro, células gliales, médula ósea, ganglios linfáticos, endotelio
P2Y ₁₄	UDP-glucosa>UDP-galactosa>UDP-Glucurónico>UDP-N-acetilglucosamina ATP, ADP, UTP, UDP inactivos		G ₁₀ Activación PLC	Placenta, adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón

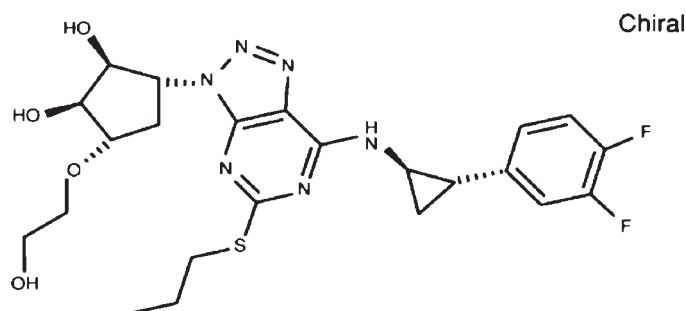
pidina y el clopidogrel. Al clonar este receptor y conocer su secuencia se pudo comparar con la de algunos pacientes con anomalías en la coagulación sanguínea y se observó por vez primera que algunas de las coagulopatías hereditarias se debían a las alteraciones en la secuencia del gen del P2Y₁₂ (Hollpeter *et al.*, 2001).

La caracterización molecular del P2Y₁₂ ha permitido el desarrollo de mejores fármacos antiagregantes plaquetarios para tratar las enfermedades cardiovasculares. Es de destacar que el clopidogrel es un profármaco que al ser administrado necesita ser metabolizado en hígado para producir el metabolito activo. Por lo tanto la respuesta al clopidogrel depende de la presencia del citocromo P450, en los microsomas hepáticos en este caso del CYP2C19, que presenta múltiples alelos con mayor o menor actividad metabolizadora. El metabolito generado se une irreversiblemente al receptor plaquetario bloqueando el receptor P2Y₁₂ durante toda la vida de la plaqueta. Los efectos secundarios del clopidogrel movilizaron a los investigadores de las principales industrias farmacéuticas para buscar un inhibidor reversible y eficaz, con buena disponibilidad por vía oral. El resultado fue la síntesis del Ticagrelor, el primer compuesto que se une reversiblemente al P2Y₁₂ y que se administra por vía oral (Husted & van Giezen; 2009; Michelson, 2009; Cattaneo, 2011).

Ahora que conocemos las secuencias de los miembros de la familia P2Y, podemos establecer los dendrogramas con las analogías de secuencia y comparar sus propiedades. Curiosamente estas analogías de secuencia se reflejan en las propiedades de afinidad por sus agonistas naturales. Farmacológicamente, los receptores P2Y se pueden clasificar atendiendo a la afinidad que muestran frente a los nucleótidos de adenina y uridina. Aunque estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies, los receptores P2Y pueden dividirse en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y₂ y P2Y₄), y por último el P2Y₆, que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el del P2Y₁₄, activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (von Kugelgen, 2006; Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007).

7.3. Principales cascadas de señalización de los receptores P2Y

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ están acoplados principalmente a la fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína G_{q/11} insensible a toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC/IP₃, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca²⁺ mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares, y activan la proteína quinasa C (PKC) en las células que los expresan, activando así numerosas cascadas de señalización secundarias, como la cascada de las MAP quinasas en astrocitos. Una cascada de señalización



Ticagrelor

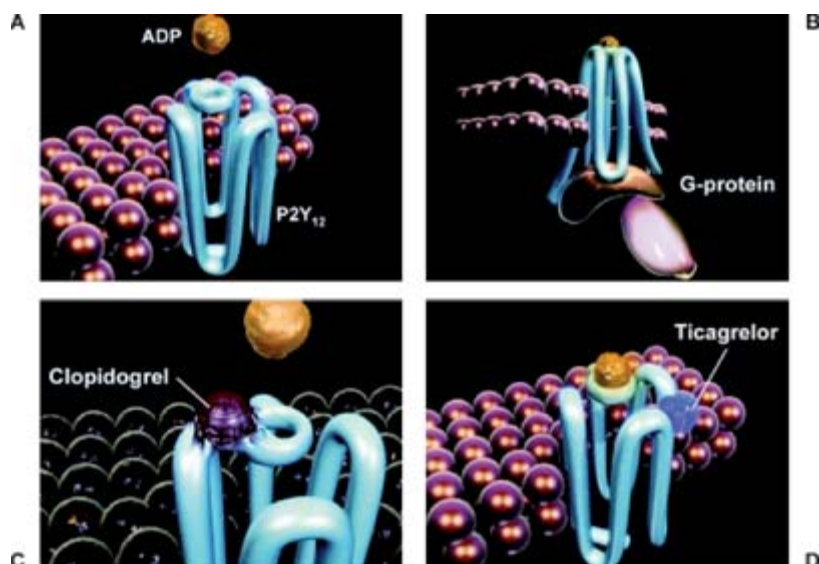


FIGURA 3. Receptor $P2Y_{12}$ y sus agonistas y antagonistas: **A.** receptor $P2Y_{12}$ en la membrana de la plaqueta sin ligando unido. **B.** Unión del ADP al receptor $P2Y_{12}$ y cambio conformacional para unirse a las proteínas G de la cara interna de la membrana plasmática. **C.** El metabolito activo del clopidogrel se une irreversiblemente al receptor $P2Y_{12}$, impidiendo la unión del ADP. **D.** El ticagrelor es un inhibidor del receptor $P2Y_{12}$ reversible y que no interfiere con la unión del ADP, pero impide el cambio conformacional que le permite unirse a la proteína Gi y por lo tanto su efecto fisiológico. Modificado de (Husted & van Giezen, 2009).

totalmente nueva y relacionada con plasticidad y posible clave de la astrogliosis reactiva es la ruta descubierta en nuestro laboratorio por las Doctoras Esmerilda García Delicado y Luz María Gutiérrez Carrasquero, estando incluida en la Tesis Doctoral de esta última. La señalización es la de activación de la Protein Kinasa D, PKD, y su efecto en la fusión de membranas subcelulares implicadas en la dinámica del interior celular (Carrasquero *et al.*, 2010).

Los receptores P2Y clonados recientemente, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína sensible a la toxina pertúsica Gi/o, aunque el P2Y₁₃ y el P2Y₁₄ pueden, de modo adicional, producir incrementos de calcio (Abbracchio *et al.*, 2006). Nuestro grupo identificó en el modelo de astrocitos de cerebelo en cultivo la señalización del receptor P2Y₁₃ acoplada a movilización de calcio del retículo (Carrasquero *et al.*, 2005). En estos últimos años en nuestro laboratorio hemos hecho un gran esfuerzo por identificar en cultivos neurales las vías de señalización que pueden influenciar la supervivencia. Entre los datos más relevantes destaca la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 dependiente de AKT, y la translocación nuclear de su sustrato, β -catenina, en neuronas granulares de cerebelo de rata, fenómeno que parece estar mediado por el receptor P2Y₁₃ (Ortega *et al.*, 2008). En este mismo modelo hemos constatado que los receptores P2Y dialogan con los P2X y con otros sistemas de señalización, como son los receptores tirosin quinasa, TRK, de factores de crecimiento. Este aspecto es de gran relevancia en situaciones en las cuales los niveles de factores tróficos están disminuidos, como el envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, etc., pudiendo ser parcialmente paliados por incrementos en los niveles extracelulares de nucleótidos (Ortega *et al.*, 2009, 2010, 2011).

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca²⁺ o K⁺, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vaniloides (Lechner & Boehm, 2004; Abbracchio *et al.*, 2006). Estas vías de señalización en el SNC de mamíferos son importantes para la regulación de la plasticidad sináptica, la modulación de la liberación de neurotransmisores y los procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

En el cerebro humano se expresan abundantes niveles de ARNm de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₁ en comparación con otros tejidos. El P2Y₁ se expresa principalmente en corteza, cerebelo, hipocampo y ganglios basales. Por el contrario, únicamente son detectables niveles bajos o moderados del mensajero de los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ en cerebro humano (Moore *et al.*, 2001). El receptor P2Y₁₂ se localiza preferentemente en células gliales (Hollopeter *et al.*, 2001) al igual que el P2Y₁₄, descrito en líneas de astrocitos y microglía (Fumagalli *et al.*, 2003). Por último se ha descrito la presencia del receptor P2Y₁₃ en cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia nigra o núcleo caudado (Communi *et al.*, 2001; Marteau *et al.*, 2003).

Los niveles de los receptores P2Y pueden variar según el estado fisiopatológico del modelo de estudio, generalmente en estas situaciones se modifican muchos parámetros y familias de receptores, y por ello haremos un apartado dedicado a estos modelos en los que intentamos reproducir una anomalía o enfermedad específica.

8. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE NUCLEÓTIDOS, FAMILIA P2X: IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y LA ELECCIÓN DE LOS MODELOS DE ESTUDIO

Los receptores P2X son canales iónicos operados por ligando, insertados en la membrana plasmática cuyo agonista fisiológico es fundamentalmente el nucleótido ATP. La apertura del canal permite el paso selectivo de los cationes de tamaño pequeño, Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Hasta la fecha se han identificado siete subunidades P2X diferentes, secuencialmente referidas como P2X1 al P2X7. El número de subunidades que se unen para formar el canal activo es de tres y el grupo de investigación alemán liderado por Gunter Schmalzing fue quien en un principio lo definió claramente para el receptor P2X1 y P2X3 (Nicke *et al.*, 1998). La primera subunidad identificada fue la P2X1 y fue publicada en la revista Nature en 1994, por el grupo de Gary Buell en el Instituto de Biología Molecular que la compañía farmacéutica de Glaxo tenía en Ginebra, Suiza (Valera *et al.*, 1994). El título de la publicación indicaba que se trataba de una nueva clase de receptores ionotrópicos operados por ligando que respondían a ATP. El modelo de estudio del cual se aisló y purificó el DNA codificando por el P2X1, era el del conducto deferente de rata, canal que conduce los espermatozoides desde el testículo a la salida en la eyaculación. Este modelo había sido propuesto por Geoffrey Burnstock, quien había establecido claramente una respuesta ionotrópica para los nucleótidos en la función del conducto deferente. El cDNA del potencial receptor P2X1 al ser expresado en ovocitos de *xenopus* se activaba por ATP, permitiendo la apertura de un canal selectivo para cationes y con alta permeabilidad para el calcio. Otra característica era su rapidísima desensibilización. Igualmente en este artículo se predecía la estructura en base a la secuencia de aminoácidos como una proteína con dos dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo en el interior citosólico. Lo que significaba algo totalmente nuevo y posiblemente muy primitivo desde el punto de vista evolutivo dada su sencillez.

El segundo receptor clonado fue el P2X2, y lo realizó el grupo de David Julius en el departamento de Farmacología de la Universidad de California. Según los conocedores del tema, este debía de haber sido el primero, y las maniobras de otros grupos poderosos retrasaron su publicación en la revista Nature, aunque aparece en el mismo volumen y año que el P2X1 (Brake *et al.*, 1994). El modelo del cual se aisló el P2X2 es el de la médula adrenal y de otros tejidos neuroendocrinos. Este receptor mos-

traba, por predicción de secuencia una estructura similar al P2X1, pero también con el canal epitelial de Na⁺, y los canales sensores de ácido todos ellos aparentemente muy primitivos. Al ser activado por ATP, la desensibilización del receptor era moderadamente rápida.

Posteriormente se identificaron mediante analogía de secuencia otros receptores P2X, de algunos daremos detalles por aspectos concretos relevantes. Conocemos hoy día la localización cromosomal de estos receptores. Tanto la subunidad P2X4 como la P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a las subunidades P2X1 y P2X5 (brazo corto del cromosoma 13). Sin embargo el resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar, por ejemplo, las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X2. Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismos, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada.

8.1. Características estructurales y oligomerización de los receptores P2X

Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (Khakh & North, 2006). El tamaño de las subunidades P2X varía entre los 379 aminoácidos del receptor P2X6, que es el más pequeño, y los 595 aminoácidos del P2X7, que es el de mayor tamaño. Poseen dos regiones transmembrana (TM1 y TM2) y los extremos N- y C- terminal citosólicos, con motivos de unión a proteínas quinasas. Mientras que el extremo N-terminal tiene un tamaño uniformemente corto (24-31 aa) en todas las subunidades, el extremo C-terminal es muy variable en secuencia y tamaño: muy corto en los receptores P2X1, P2X3, P2X4 y P2X6, intermedio en los P2X2 y P2X5 e inusualmente grande en la subunidad P2X7, con más de 200 aa y un dominio hidrofóbico extra. Este hecho sugiere que el extremo carboxilo-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor.

Por otro lado, entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este dominio posee alrededor de 280 aminoácidos, 93 de los cuales se encuentran altamente conservados en, al menos, seis de las siete subunidades P2X (Vial *et al.*, 2004).

Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Burnstock, 2007; Illes, 2004; King, 2003; Khakh, 2001; North, 2002; Norenberg, 2000; Chambers, 2010; Chen, 2010

TABLA 3. **Clasificación de los receptores P2X homoméricos.**
 Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Burnstock, 2007; Illes, 2004; King, 2003; Khakh, 2001; North, 2002; Norenberg, 2000; Chambers, 2010; Chen, 2010

Receptor	EC ₅₀ (ATP)	Potencia de agonistas (EC ₅₀)	Antagonistas (IC ₅₀)	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X1	0,1 μM	ATP=2Me SATP≥Ap ₄ A≥α,β-meATP>BzATP>ADP	NF449>TNP-ATP>Ip5I>MRS2257>PPADS (rango nM) Suramina>RB 2 (rango μM)	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X2	5 μM	ATP ≥ATP>S≥2Me SATP>Ap ₄ A α,β-meATP y ADP inactivos	RB 2=NF279, NF770>PPADS= TNP-ATP=BBG>Suramina (rango μM)	H ⁺ ↑ Zn ²⁺ ↑ Cu ²⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X3	1,3 μM	2Me SATP≥ATP= α,β-meATP>Ap ₄ A>ADP	TNP-ATP>MRS2257=A317491> MRS2159=PPADS (rango nM) NF279=NF449>Ip5I≥Suramina>NF023>RB 2 (rango μM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X4	4 μM	ATP>2Me SATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (rango μM) fenolftaleína	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↑ Cd ²⁺ ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X5	0,4 μM	ATP=2Me SATP=Ap ₄ A> α,β-meATP y ADP inactivos	PPADS>TNP-ATP>Suramina> RB 2 (rango μM)	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X6	0,6 μM	2Me SATP>ATP=α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP> PPADS Insensible a Suramina	---	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X7	400 μM	BzATP>>ATP 2Me SATP, ATP γS y ADP inactivos	A-740003 = A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) PPADS=TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) Derivados de pirazolacetamida (rango nM) 2-Cloro-N-((4,4-difluoro-1-hidroxiciclohexil)metil)-5-(5-fluoropirimidina-2-il) benzamida (rango nM)	H ⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel

cebra por Miguel Díaz Hernández, profesor de la facultad de Veterinaria de la UCM, durante su estancia en San Luis, USA, con el grupo del doctor Mark Voight (Díaz-Hernández *et al.*, 2002).

Como se muestra en la Figura 5, cada subunidad presenta una estructura en forma de delfín con las hélices transmembrana y la región extracelular semejantes a la cola y el cuerpo, respectivamente (Kawate *et al.*, 2009). La arquitectura central del cuerpo extracelular está caracterizada por dos dominios de β -lámina que otorgan rigidez y resistencia a cambios conformacionales. El dominio de la cabeza se define por tres β -láminas antiparalelas y una α -hélice. En esta región extracelular se encuentran también altamente conservados diez residuos de cisteína que forman series de puentes disulfuro y así contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria, así como numerosos sitios de glicosilación, necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando.



FIGURA 5. **Modelo estructural de las subunidades P2X humanas.** Los colores en la estructura de la subunidad P2X representan las diferentes partes del delfín: en verde la cola, en azul el cuerpo, la cabeza en rosa, la aleta dorsal en naranja y las aletas laterales en rojo y amarillo. Adaptado de Kawate y cols., 2009.

Los dos segmentos transmembrana (TM) que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, motivo por el que las distintas subunidades se asocian como homo- o heterotrímeros para formar un canal funcional (Nicke *et al.*, 1998). El trímero posee un dominio extracelular muy extenso que sobresale aproximadamente 70 Å sobre el plano de la membrana, y una región transmembrana de 28 Å.

(Figura 6). El canal está formado por seis hélices TM, dos por cada subunidad que lo compone. Los segmentos TM1 forman múltiples interacciones con las hélices TM2 de la misma subunidad, pero también con los TM1 y TM2 de las otras subunidades. Así, las hélices TM1 presentan la mayoría de contactos con la bicapa lipídica, mientras que las TM2 cubren el poro iónico (Gonzales *et al.*, 2009). La entrada y salida del canal están formadas principalmente por residuos hidrofóbicos e incluyen aproximadamente dos vueltas de las α -hélices de los TM2. En la región extracelular, las β -láminas centrales interactúan con las subunidades adyacentes, mientras que no se producen contactos entre ellas en la base de dicha región. Esta conformación podría permitir a las hélices TM el movimiento hacia una conformación abierta ante la interacción de la región extracelular con el ligando (Kawate *et al.*, 2009).

En este sentido, Gouaux y su grupo proponen que el sitio de unión del ATP a los receptores P2X se localiza en las ranuras que quedan entre las distintas subunidades (Kawate *et al.*, 2009). Estas ranuras están formadas por residuos conservados que se han descrito implicados en la apertura del canal dependiente de ATP (Roberts *et al.*, 2006).

Los receptores homoméricos están compuestos por subunidades idénticas, aunque la interacción entre las subunidades P2X5 y P2X6 presenta mayor dificultad. Además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interactuar entre sí formando hetero-oligómeros, aunque este ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X. Hasta la fecha se han descrito varios receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6 y P2X4/P2X6 (Roberts *et al.*, 2006; Abbracchio *et al.*, 2009). La heteromerización de la subunidad P2X7 aun no está claramente establecida ni descartada. Durante mucho tiempo se pensó que únicamente formaba homo-oligómeros, sin embargo, en el año 2007 se propuso su intervención en heterómeros funcionales con la subunidad P2X4 (Guo *et al.*, 2007). Por el contrario, estudios posteriores indican que estos trímeros no son estables o no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados.

Los receptores P2X no están insertados en la membrana celular de forma aleatoria, y suelen estar agrupados o localizados en diferentes partes de la célula de modo preciso y específico en función del desarrollo. A modo de ejemplo, respuestas inducidas por el receptor P2X2 se registraron de las terminales pre-sinápticas de las interneuronas hipocámpales, pero no en el soma neuronal (Khakh *et al.*, 2001; Khakh & North, 2006). Dado que la membrana celular no es homogénea, los receptores pueden agruparse junto a las proteínas de membrana en microdominios. Un posible mecanismo para mantener las proteínas y moléculas de señalización juntas puede ser su inclusión en balsas lipídicas («lipid rafts»), como sucede para los receptores P2X1, P2X3 y P2X7 (Vacca *et al.*, 2004; 2009). Sin embargo, otros receptores, como los P2X2, P2X4, no parecen estar asociados a lipid rafts, al menos en el modelo de las neuronas granulares del cerebelo en cultivo (Vacca *et al.*, 2004).

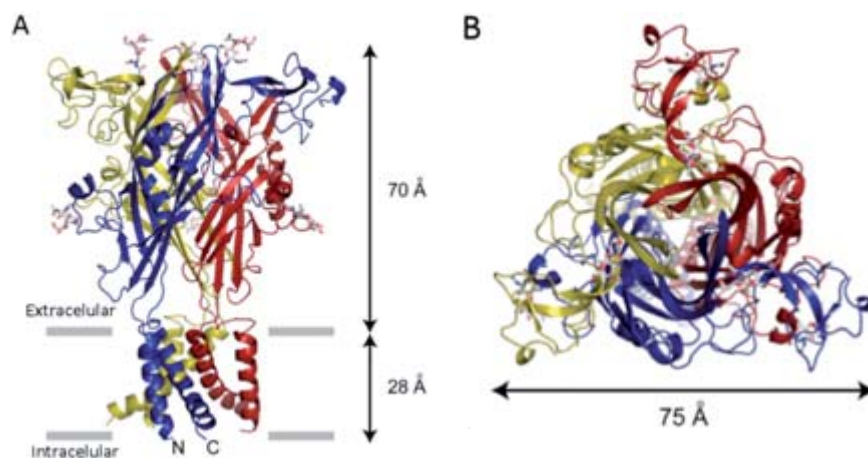


FIGURA 6. **Modelo estructural de los receptores P2X triméricos.**
 Cada subunidad se representa en un color diferente. **A.** Vista en paralelo a la membrana. **B.** Vista perpendicular a la membrana desde el espacio extracelular.
 Adaptado Kawate y cols., 2009.

8.3. Características funcionales y regulación de los receptores P2X

Las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores P2X dependen de las subunidades que componen el canal. Los diferentes receptores P2X pueden ser clasificados en función de su perfil de respuesta, su afinidad por agonistas y antagonistas y su sensibilidad ante la regulación por calcio, magnesio, protones o zinc. En los receptores heteroméricos las características pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo forman, o ser una combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor. Sin embargo, es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades complicando el estudio de las mismas.

La activación de los receptores P2X produce la entrada rápida (milisegundos) y no selectiva de cationes Ca^{2+} , Na^{+} o K^{+} . La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada, aunque también puede modificarse dependiendo de su regulación. Los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido pierden la respuesta en presencia continuada del agonista (desensibilización), cayendo dicha respuesta en un 90% en 1-2 segundos. Las respuestas de los otros receptores P2X son mucho más sostenidas, situándose en el extremo contrario el receptor P2X7, cuya respuesta se mantiene durante minutos (North, 2002). En algunos casos la desensibilización sucede como consecuencia de la constitución de una forma cerrada del receptor unido al agonista, requiriéndose varios minutos de lavado para recobrar la funcionalidad completa (Rettinger and Schmalzing, 2003; 2004). Esta recuperación puede regularse por muchos factores, incluyendo el agonista empleado, el

calcio o la posibilidad de modificaciones por cascadas de señalización (Díaz-Hernández *et al.*, 2004).

Los estudios de la apertura y cierre del canal y la conductividad de iones en estos receptores indican que la regulación de estos dos componentes está mediada por la interacción de varias regiones de los mismos. Es muy posible que se produzcan cambios conformacionales en el dominio extracelular de los receptores P2X, semejantes a los vistos en otros receptores ante la unión de su ligando. Estos cambios coordinarían la unión de alta afinidad de los grupos adenina y trifosfato del ATP a estos receptores, lo que explicaría la selectividad de los P2X por determinados ligandos. En la región extracelular de varios receptores P2X, existen residuos conservados de prolina y glicina que podrían dotar de flexibilidad y estar implicados en cambios conformacionales ante la unión del agonista (Nakazawa *et al.*, 2002). Por otro lado, varios estudios con receptores P2X quiméricos demuestran cómo la interacción entre los dos segmentos transmembrana de los receptores modula la apertura y cierre de los canales (Haines *et al.*, 2001).

El dominio intracelular también colabora en la regulación de la apertura del canal y la permeabilidad iónica. A modo de ejemplo, las mutaciones que eliminan la secuencia de unión a PKC, presente en la zona N-terminal del receptor y que se encuentra constitutivamente fosforilada, pueden aumentar la velocidad de desensibilización de ciertas isoformas. Esto pone de manifiesto que el extremo N-terminal participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Ennion *et al.*, 2002). En cuanto al extremo C-terminal, conserva en todas las isoformas un motivo YxxxxK, cercano al TM2, que está asociado al correcto transporte del receptor a la membrana y a la estabilización de su expresión en la superficie celular (Chaumont *et al.*, 2004).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el Cu^{2+} y el Zn^{2+} (North, 2002). Kawate del grupo de Eric Gouaux ha propuesto recientemente la presencia de cuatro sitios de unión de cationes di- y trivalentes, uno en el centro de la región extracelular, los otros tres en la periferia del receptor (un sitio por cada subunidad), y una regulación negativa del receptor por parte de estos iones (Kawate *et al.*, 2009).

A su vez, los receptores P2X pueden modularse a través de diversas acciones sobre su dominio intracelular. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio regulan de forma importante la actividad de los receptores. Por ejemplo, en la zona de transición entre el dominio TM2 y el C-terminal del receptor P2X7 se localiza una tirosina (Tyr343), cuya defosforilación tras la activación del canal reduce la duración de la respuesta (Becker *et al.*, 2008).

La actividad de los receptores P2X también puede verse regulada por gran variedad de componentes, como receptores acoplados a proteínas G, de serotonina, purinérgicos metabotrópicos P2Y y otros muchos (Vial *et al.*, 2004). En las terminales presinápticas de cerebro medio de rata nuestro grupo ha demostrado que los receptores acoplados a proteínas Gi , como los GABA_B y los de adenosina A1 potenciaban la respuesta ionotrópica gene-

radas por los receptores P2X (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2003). Un aspecto relevante es la regulación de los receptores P2X por los receptores colinérgicos nicotínicos mediada por fosforilación mediante la activación de la proteína CaMKII (Díaz-Hernández *et al.*, 2004 y 2006).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), proteína quinasa C (PKC), la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) y un largo etc. (Díaz-Hernández *et al.*, 2004; 2006; 2008; León *et al.*, 2006; Gómez-Villafuertes *et al.*, 2009 Ortega *et al.*, 2009).

Un aspecto del que es necesario dejar constancia es que los mejores agonistas fisiológicos que los receptores P2X1 y P2X3 son los diadenosina polifosfatos, concretamente el Ap5A. Las terminales nerviosas responden a Ap5A, con una robusta respuesta ionotrópica, que no es mimetizada por el ATP, dejando un resquicio para la existencia de otros receptores o subunidades P2X todavía no clonadas (Díaz-Hernández *et al.*, 2001).

8.4. Aspectos fisiológicos de los receptores P2X deducidos de los ratones genéticamente modificados

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos muy limitadas, e incluso existen agonistas y antagonistas que, a las mismas concentraciones, pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y. Los animales genéticamente modificados han permitido conocer aspectos de la función fisiológica de los receptores P2X, que eran difíciles de abordar de otro modo.

El primer ratón genéticamente modificado, knock-out, KO, para los receptores P2X lo fue para el P2X1. En enero del año 2000, el grupo de Richard Evans y Gary Buell, publicaron en Nature el modelo de ratón carente de P2X1 funcional, P2X1 $-/-$. La delección del gen reduce la capacidad contráctil del vaso deferente en el macho, la disfunción en la eyaculación está asociada a una infertilidad reducida en hasta un 90%. Aparentemente las hembras y los heterocigotos no presentan unas características de fenotipo aparentes. Proponían los autores que como los machos, son potentes y copulan con normalidad, aunque infértiles, este receptor podría ser una diana para el control tanto positivo como negativo de la fertilidad en humanos (Mulryan *et al.*, 2000).

Desde entonces se han realizado estudios en modelos animales para comprender en profundidad los aspectos fisiológicos de la carencia del receptor P2X1. La presencia del P2X1 en las arteriolas renales y músculo liso de otros muchos vasos, así como en las uniones neuromusculares en

la zona presináptica, se ven alteradas y nos hacen entrever el complejo sistema y funciones todavía por descubrir para este receptor (Inscho *et al.*, 2003).

El ratón deficiente en P2X3, knock-out, fue el siguiente en ser publicado y fue antes de finalizar el mismo año 2000, en octubre, por Debra Cockayne y su grupo que por entonces trabajaba en la unidad de Neurobiología en el centro de investigación de Roche en Palo Alto California. El ratón presentaba alteraciones de la vejiga urinaria, con dilatación, al tener reducido el reflejo de vaciado y también era notoria la menor sensibilidad al dolor (Cockayne *et al.*, 2000). Estos resultados se correspondían con la expresión de este receptor en las fibras sensitivas de pequeño diámetro y en las que inervan el intestino y la vejiga. Los autores proponían que los antagonistas de este receptor podrían tener un potencial terapéutico para el tratamiento del dolor y de la incontinencia urinaria. Siendo este aspecto relevante para las personas de más edad.

Posteriormente se consiguieron animales dobles knock-outs, para el receptor P2X2 y P2X3, y se confirmó su utilidad para comprender la importancia del sistema purinérgico en la sensación del dolor visceral y mecanosensitivo (Burnstock, 2009). Los resultados obtenidos con modelos genéticamente modificados han sido puestos en entredicho y no todos los investigadores están de acuerdo con los efectos fisiológicos publicados (Devries *et al.*, 2010). Los animales genéticamente modificados para obtener el KO del receptor P2X7 serán tratados en un apartado posterior.

En cuestión de modelos animales se ha iniciado una nueva era debido a la gran empresa científica iniciada en los Institutos Nacionales de la Salud, NIH, por Jeff Litchmann para marcar todos y cada uno de los genes con un marcador fluorescente para conocer su expresión en la edad adulta y durante el desarrollo. Estos modelos están proporcionando herramientas valiosísimas en el sistema purinérgico. Uno de estos modelos será descrito en el apartado dedicado al receptor P2X7.

8.5. El receptor P2X7: descubrimiento, los desconcertantes knockout y complejidad de su procesamiento

La última subunidad de la familia P2X en ser identificada fue la P2X7. El grupo de Gary Buell y Annmarie Surprenant la aisló y clonó de los macrófagos humanos, en los cuales la respuesta a ATP en ausencia de magnesio producía un poro citolítico. El supuesto receptor que respondía a ATP era denominado con anterioridad P2Z. El estudio de la secuencia del receptor clonado demostró que tenía una estructura similar a los otros miembros de la familia P2X, con dos hélices transmembranares y como característica diferencial la presencia de un largo extremo C terminal y una baja afinidad por el ATP (Surprenant *et al.*, 1996). El descubrimiento fue realizado en el Instituto de Biología Molecular que la compañía farmacéutica Glaxo tiene en Ginebra, Suiza, de donde han salido un gran número de descubrimientos relacionados con el sistema purinérgico.

El mismo grupo del doctor Gary Buell estudió posteriormente la organización genómica del receptor P2X7 humano, demostrando por hibridación cromosomal *in situ* que se encontraba en el cromosoma 12 (12q24) y que contenía 13 exones. Mediante la técnica de mapeo de radiación híbrido se pudo determinar que estaba a una distancia de 130 kb del gen homólogo que codifica la subunidad P2X4 (Buell *et al.*, 1998). Desde entonces se ha acumulado mucha información y conocemos actualmente la existencia de dos nuevos exones: en humano el exón N3, localizado en la región intrónica entre el exón 2 y el 3 (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005), y en ratón el exón 1', localizado en la región intrónica entre el exón 1 y el exón 2 (Nicke *et al.*, 2009).

De especial relevancia ha sido el trabajo de Annette Nicke realizado en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Max Planck para la investigación del Cerebro, localizado en Frankfurt, Alemania. Este trabajo surge de una observación previa de nuestro laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la UCM, en el cual el doctor Jesús Sánchez-Nogueiro y Patricia Marín García, estudiando los ratones genéticamente modificados y «supuestamente» knock-out para el gen P2X7, encontraron de modo sorprendente que presentaban respuestas análogas a las de este receptor al que denominaron «P2X7-like». Los estudios forman parte de la Tesis Doctoral de Patricia Marín y fueron efectuados en cultivos de neuronas de cerebelo midiendo la respuesta en calcio al agonista más específico del P2X7, el benzoil-ATP, BzATP mediante video microscopia y microfluorimetría (Sánchez-Nogueiro *et al.*, 2005).

Los animales genéticamente modificados, bloqueando el primer exón del P2X7, resultaron fallidos, pues no contaban con el segundo exón de iniciación. El modelo generado por la compañía farmacéutica Pfizer y posteriormente de modo similar por Glaxo, originaron muchos problemas y controversias, al exigir en muchas revistas científicas de gran prestigio validar resultados del P2X7 en un animal KO, que no lo era a todos los efectos (Nicke *et al.*, 2009). Un estudio reciente del grupo de Murrell-Lagnado, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Cambridge, Reino Unido, ha ampliado y reevaluado los P2X7 knock-outs existentes y puestos también en el contexto de las variantes truncadas del carboxilo terminal (Masin *et al.*, 2012).

Hasta la fecha se han descrito diez variantes de procesamiento (splicing) (P2X7b-P2X7k) (ver Figura 6), nueve en humanos (P2X7b-P2X7j) y una en rata y ratón (P2X7k), aunque sólo cuatro de estas variantes se han detectado a nivel proteico (P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k) (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Nicke *et al.*, 2009), y solo dos de ellas parecen ser funcionales (P2X7b y P2X7k) (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Nicke *et al.*, 2009). La variante P2X7a es la proteína completa.

Como se muestra en la Figura 7, el ARNm de la variante P2X7b conserva el intrón localizado entre los exones 10 y 11, que introduce un nuevo codón de stop. Esto genera una proteína más pequeña que la P2X7a, que ha perdido los últimos 171 aminoácidos de la proteína completa, y presenta

los 18 aminoácidos posteriores al TM2 alterados, además de una menor sensibilidad a la activación por BzATP (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005).

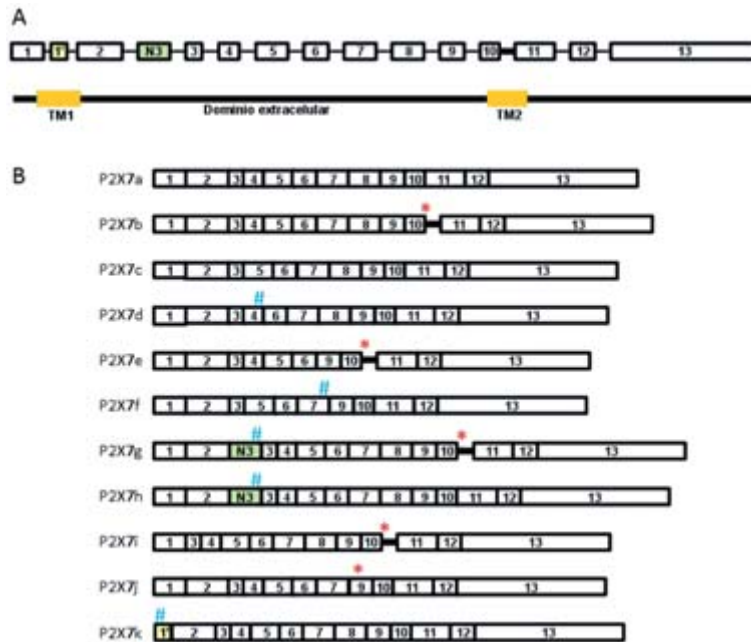


FIGURA 7. Estructura del gen del receptor P2X7 y las variantes con procesamiento alternativo. **A.** Estructura propuesta del gen P2X7. Los exones están numerados e indicados como cajas. Los intrones se representan como líneas horizontales entre los exones. Bajo la estructura genómica se muestra la estructura del ARN mensajero. TM1 y TM2: segmentos transmembrana 1 y 2. **B.** Organización de los exones en el ARNm de las variantes con procesamiento alternativo del gen del receptor P2X7 aislados hasta el momento. Los nuevos codones de inicio se representan como # y los nuevos codones de stop como * (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Nicke *et al.*, 2009).

El ARNm de la variante P2X7h incluye el exón N3, que crea un nuevo codón de inicio. Este nuevo codón genera la traducción de una proteína de P2X7 de 70 KDa aproximadamente, que ha perdido el dominio TM1 y no es funcional.

La variante P2X7j carece de exón 8, lo que genera la aparición de un nuevo codón de terminación en el exón 9 (Figura 7). Así, la proteína pierde el extremo C-terminal, el dominio TM2 y un tercio del bucle extracelular próximo al TM2, generando un extremo C-terminal alterado, y una sub-unidad P2X7 de 42 a 45 KDa. Esta variante es deficiente en la unión al ligando, pero es capaz de interactuar con la variante P2X7a y bloquear su actividad (Feng *et al.*, 2006).

Por último, el ARNm de la variante P2X7k incluye el exón 1' que codifica para 39 aminoácidos que sustituyen a los primeros 42 aminoácidos de

la subunidad P2X7a. Esto genera un extremo N-terminal y un dominio TM1 alternativos que incrementan la sensibilidad del receptor por el agonista y el tiempo necesario para la inactivación del receptor (Nicke *et al.*, 2009).

El grupo de Gorodeski, al cual pertenece el doctor Feng, en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Ciencias de la Salud en Bethesda, Maryland en USA, realizó importantes estudios sobre la forma truncada del receptor P2X7j, de 258 aminoácidos, a la cual le falta un tercio del loop extracelular, el segmento transmembrana 2 y toda la zona carboxilo terminal. Esta proteína se expresa muy poco en las células normales, pero es muy abundante en cierto tipo de tumores, como es el de cuello uterino y otros tumores de células epiteliales. Su mayor expresión se ha relacionado con un peor pronóstico de este tipo de tumores.

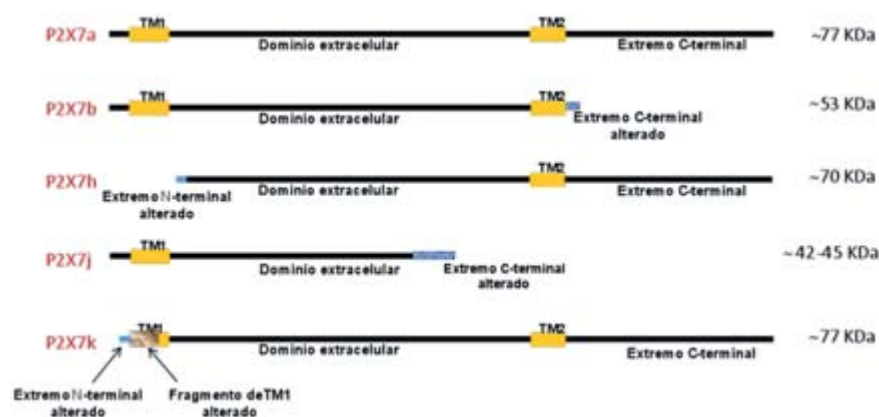


FIGURA 8. Variantes de P2X7 detectadas a nivel proteico: P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Nicke *et al.*, 2009). Solamente dos de ellas parecen ser funcionales: P2X7b y P2X7k. La variante P2X7a es la proteína completa.

8.6. Variantes SNP del receptor P2X7

La presencia del receptor P2X7 en macrófagos y linfocitos estimuló el estudio de este receptor en relación con diversos tipos de leucemias. El grupo del Profesor James Wiley en el Departamento de Medicina de la Universidad de Sidney fue el primero en descubrir que el grupo de leucemias linfocíticas crónicas tiene una incidencia familiar tres veces mayor que la esperada en la población general y parecía lógico suponer la existencia de algún factor de predisposición hereditaria que pudiera alterar los mecanismos de apoptosis del linfocito leucémico. Como el receptor P2X7 había sido implicado en la apoptosis de los macrófagos, pensaron que quizás este receptor estaba alterado y no inducía apoptosis en los linfocitos tipo B de los pacientes con leucemia familiar crónica, permaneciendo el número de linfocitos aumentado al disminuir su recambio.

El estudio de los polimorfismos del receptor P2X7 en el DNA genómico de los linfocitos periféricos de personas sanas y pacientes con leucemia detectó mutaciones en el exón 13, que codifica el carboxilo terminal en al menos un tercio de los pacientes. Los polimorfismos observados eran generalmente de un único nucleótido —SNP— y resultaban en una mutación con pérdida de función de estos receptores. La mutación más frecuente correspondía a la posición 1513 del gen del receptor P2X7, el trabajo se publicó en la revista *Lancet* y recibió numerosos comentarios (Wiley *et al.*, 2002). Similares resultados fueron publicados por el grupo de Rosenquist en el departamento de Oncología de la Universidad de Uppsala, y publicados en la misma prestigiosa revista científica y el mismo año, incidiendo en que el polimorfismo 1513 A/C es un indicador de mal pronóstico en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (Thunberg *et al.*, 2002).

Sería necesario esperar dos años para que surgieran las primeras voces discordantes, siendo publicados los primeros trabajos contradictorios, ya que varios grupos de investigadores no encuentran correlación alguna entre el polimorfismo descrito 1513 A/C del receptor P2X7 y el desarrollo clínico de la leucemia linfocítica crónica (Nuckel *et al.*, 2004). Un año más tarde el grupo del Profesor Di Virgilio, en la Universidad de Ferrara, Italia, descubre en linfocitos de pacientes con leucemia un nuevo polimorfismo, pero este con ganancia de función del receptor P2X7, que se corresponde con un cambio de la base de la posición 489 C/T que da lugar a una Histidina 155 en vez de Tirosina en la proteína codificada (Cabrini *et al.*, 2005). Actualmente se han identificado un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen del receptor P2X7 humano, algunos de los cuales están recogidos en la figura (Figura 8). La mayoría de estos SNPs confieren la pérdida de función de algunos eventos activados por el receptor P2X7 aunque algunos, como ya hemos descrito, inducen ganancia de función (Cabrini *et al.*, 2005). Una interesante revisión de la importancia de los polimorfismos en el tráfico intracelular del receptor P2X7 humano y su mayor o menor presencia en la membrana plasmática de diversas células ha sido recientemente publicada por el grupo del Profesor Baldwin de la Universidad de Leeds, Reino Unido (Bradley *et al.*, 2011).

La presencia del receptor P2X7 en otras células, como es el caso de las neurales, hizo plantearse la repercusión de los polimorfismos del gen en diversas patologías neurales. Uno de los primeros trabajos fue la asociación del polimorfismo en los genes del cromosoma 12Q24.31, justo en la región que codifica el P2X7, con la susceptibilidad a sufrir desórdenes afectivos bipolares. El polimorfismo más relevante cambiando una Gln460/Arg ocurre en un aminoácido que está conservado entre humanos y roedores y está localizado en el dominio C-terminal (Barden *et al.*, 2006). Otras publicaciones han tratado de relacionar los polimorfismos del P2X7 con los estados de ansiedad y depresión (Roger *et al.*, 2010).

Otras variantes de un único SNP han sido relacionadas con la posibilidad de mayor susceptibilidad a sufrir la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Chron), artritis reumatoide, toxoplasmosis, etc..., siendo necesario un estudio más amplio para conocer los límites y la utilidad de

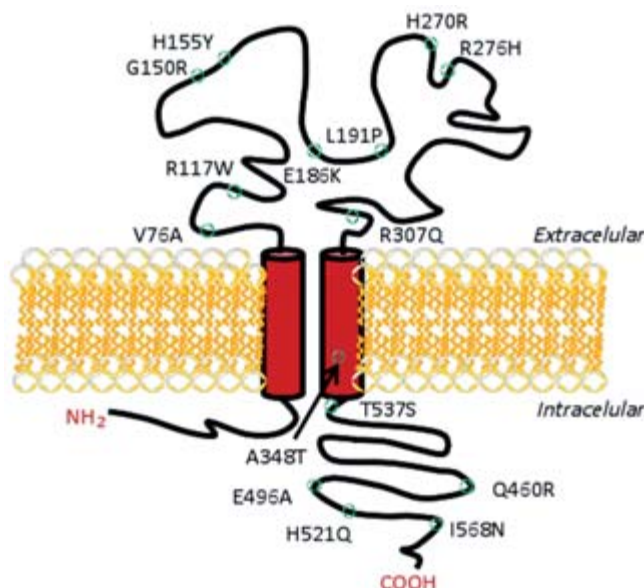


FIGURA 9. Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7. Datos obtenidos de Stokes y cols., 2010, y Roger y cols. 2010.

la información científica. Un aspecto totalmente novedoso relacionado con los polimorfismos SNP, ha sido puesto de manifiesto en el Instituto de Química Médica de la Universidad Semmelweis de Budapest en Hungría. En el cual se ha tratado de analizar si existe una regulación post-transcripcional mediada por los microRNAs (miRNAs) del P2X7. La cuestión es si los SNPs descritos en los genes que pueden ser candidatos a genes relacionados con la depresión y otros trastornos psiquiátricos tienen alguna posibilidad de ser zonas de control por los miRNAs. Como el gen P2X7 ha sido propuesto como gen relacionado con la depresión mayor y trastornos bipolares por su asociación con el polimorfismo (Gln460Arg), se ha puesto a punto una nueva metodología para analizar si existe un sitio polimórfico en el receptor P2X7 que pueda ser la diana de un microRNA (Rahman *et al.*, 2010). Es el primer trabajo tratando de relacionar el control de la expresión del P2X7 mediante los miRNA, es posible que en un futuro aparezcan nuevos datos relacionados con este nuevo mecanismo en los receptores purinérgicos en general.

8.7. Características farmacológicas del receptor P2X7

La estimulación del receptor con agonistas durante un breve periodo de tiempo (<10 segundos) conduce a una apertura rápida y reversible del canal, que permite el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Como se ha mencionado

anteriormente, los receptores P2X7 homoméricos son activados por elevadas concentraciones de ATP (EC_{50} 400 μ M) y por BzATP, siendo este último significativamente más potente (20 μ M) que el ATP. El grupo de Surprenant en la Universidad de Sheffield ha estudiado con detenimiento los residuos que median en las respuestas tanto a ATP, como al BZATP (Young *et al.*, 2007). Las diferencias de afinidad entre especies son notables con respecto al P2X7 y la rata es unas diez veces más sensible al ATP y 100 veces más sensible al BzATP que el ratón. En estos estudios también definieron claramente que la afinidad reside solamente en la secuencia de aminoácidos del loop extracelular. Cambios de un único aminoácido entre especies pueden dar cuenta de cambios muy acusados en la eficacia de los agonistas y antagonistas.

El BzATP fue usado durante mucho tiempo como un agonista específico del receptor P2X7. Sin embargo el BzATP no es un agonista selectivo del receptor P2X7, puesto que también activa los receptores P2X1 y P2X3 y receptores de la familia metabotrópica P2Y. En nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto que también es un agonista del receptor metabotrópico P2Y₁₃ en astrocitos de cerebelo de rata (Carrasquero *et al.*, 2009).

Es una característica del receptor P2X7 la potenciación de sus respuestas al reducir la concentración de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio, en el medio extracelular. Otros cationes divalentes como el zinc y el cobre también inhiben la respuesta en estos receptores (Virginio *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008). Estas observaciones indican que, bien es la forma ATP⁴⁻ el ligando activo de esta subunidad, o bien los cationes divalentes son capaces de inhibir dicho receptor alostéricamente.

Los antagonistas más empleados con los receptores P2X y P2Y, suramina y PPADS, no son selectivos para el receptor P2X7 y lo bloquean con baja afinidad y de forma no competitiva. El colorante alimentario Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo, sobre todo en rata ($IC_{50} \sim 10$ -15nM) y en ratón (IC_{50} 100 nM), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ($IC_{50} \geq 10\mu$ M) (Young *et al.*, 2007). El BBG se une al receptor en un sitio de unión diferente al del ATP y el equilibrio de disociación se establece lentamente (Michel *et al.*, 2007). El ATP oxidado (oATP) es un inhibidor irreversible de los receptores P2X7 que requiere incubaciones de una a dos horas para inhibir la activación de los canales (Di Virgilio, 2003), sin embargo posee otras acciones farmacológicas como bloqueo de los receptores P2X1 y P2X2 o reducción de la señalización proinflamatoria, lo que hace que su utilización ofrezca resultados confusos o de difícil interpretación (Evans *et al.*, 1995).

Otros inhibidores, como el KN-62 (conocido como inhibidor de la calcio/calmodulina quinasa tipo II, CaMKII), ejercen su efecto en función de la especie, bloqueando el receptor P2X7 humano de forma no competitiva, pero no el de rata (Gargett & Wiley, 1997; Humphreys *et al.*, 1998). En 2006 los laboratorios Abbot generaron dos nuevos antagonistas selectivos para el receptor P2X7, el A-438079, tetrazol que bloquea de forma competitiva y reversible los receptores P2X7, y el A-740003, cianoguanidina que actúa de forma competitiva sobre los receptores, ambos con ac-

ción tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2006). Recientemente se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers *et al.*, 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una IC_{50} en el rango nanomolar (Chen *et al.*, 2010).

El P2X7 es el receptor que menos se desensibiliza y sus corrientes se mantienen en presencia de ATP y BzATP durante aplicaciones prolongadas (hasta minutos). Además, las aplicaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (North, 2002).

8.8. Señalización del receptor P2X7

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de los receptores P2X7 induce la apertura rápida y reversible del canal, lo que permite el paso de iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} produciendo la despolarización de la membrana. La consecuente entrada de calcio a la célula conecta con múltiples vías de señalización donde este ion es el desencadenante necesario, como son las relacionadas con la calcio calmodulina quinasa, las proteínas quinasas de tipo C sensibles a calcio, la fosfolipasa D y la cascadas derivadas, entre ellas la GSK-3 (Díaz-Hernández *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; 2010; 2011) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs). Es necesario tener en cuenta que cada tipo de células tiene sus cascadas de señalización y por lo tanto el tipo de respuestas asociados al P2X7 dependen del modelo de estudio.

En los procesos neurales la entrada de calcio al citosol es importante para la liberación de neurotransmisores mediante el proceso exocitótico. Al mismo tiempo es necesaria una reorganización del citoesqueleto para permitir la aproximación de nuevas vesículas secretoras y este proceso necesita la cascada de señalización de la calcio calmodulina, que activa la calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, lo que permite la separación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores.

El modelo de las neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo puesto a punto en nuestro laboratorio permitió medir por vez primera la liberación exocitótica del glutamato vesicular, mediante una técnica luminométrica y descubrir al mismo tiempo que el análogo del ATP, el BzATP, produce serias interferencias con las técnicas fluorescentes que utilizan peroxidasa y Amplex Red (León *et al.*, 2006; 2008).

Por otro lado, la activación del receptor P2X7 también es capaz de inducir la activación de otras proteínas en un proceso independiente de la entrada de calcio, como por ejemplo la activación de PKD en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero *et al.*, 2010).

9. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DEL RECEPTOR P2X7 EN LA MADURACIÓN NEURONAL Y DIVERSAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Mediante técnicas de hibridación *in situ* y análisis por RT-PCR se ha podido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo e hipotálamo y el hipocampo (Yu *et al.*, 2008). En un estudio de gran relevancia el prof. Zimmerman demostró que en los progenitores neurales de la zona subventricular, los receptores P2 y los ectoenzimas que los destruyen actuaban de modo secuencial en el tiempo y según el área de migración, aunque no estaba entre ellos el receptor P2X7 (Zimmermann, 2011).

Respecto a la presencia de receptores funcionales, nuestro grupo fue pionero en el estudio de la caracterización y función del P2X7 en el sistema nervioso. La idea de que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas pues su activación producía un poro citolítico que producía la muerte neuronal fue sostenida durante más de diez años por uno de los grupos ingleses más potentes. Contra esta idea fue necesario que nuestro grupo de la Facultad de Veterinaria de Madrid diseñara experimentos en los cuales se demostrará sin ningún género de dudas que las respuestas pertenecían a este receptor. Actualmente hemos conseguido que la comunidad científica internacional acepte plenamente nuestros descubrimientos. La abundante presencia del receptor P2X7 en neuronas es la antesala de su gran relevancia en procesos fisiopatológicos, estando algunos ya confirmados.

El primer trabajo demostrando claramente que el P2X7 estaba presente y era funcional lo realizamos en neuronas granulares de cerebelo, mediante técnicas de microfluorimetría y video microscopía y también en terminales sinápticas aisladas de cerebro medio de rata, analizando cada terminal sináptica de modo aislado (Miras-Portugal *et al.*, 2003).

Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas, dado que más del 50% presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad, y es posible, además, medir respuestas presinápticas en ellas al estimularlas con agonistas específicos del receptor P2X7 (Miras-Portugal *et al.*, 2003; Hervas *et al.*, 2005; Sánchez-Nogueiro *et al.*, 2009; Marín-García *et al.*, 2008). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de estos receptores, la modulación de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, el glutamato o el GABA de las terminales presinápticas del SNC (Gómez-Villafuertes *et al.*,

2001; León *et al.*, 2008; Sperlagh *et al.*, 2007; Gualix *et al.*, 2003; Díaz-Hernández *et al.*, 2002).

9.1. Importancia del receptor P2X7 en el desarrollo del axón en neuronas embrionarias

Los modelos para estudiar el funcionamiento del sistema nervioso son extremadamente complejos y constituyen uno de los grandes problemas para comprender los aspectos fisiopatológicos de las diferentes rutas de señalización y sus receptores asociados. Los cultivos neurales proveen de una herramienta muy útil para entrever mecanismos y rutas de señalización, así como los factores tróficos y de defensa frente a agresiones del medio ambiente, envejecimiento y otras situaciones, pero no son capaces de reproducir las situaciones complejas.

El descubrimiento de nichos celulares con capacidad de proliferar y diferenciarse en el giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular, ha proporcionado herramientas para comprender las primeras etapas de diferenciación entre neuronas, glía y oligodendroglia y los factores capaces de inducir su diferenciación *ex vivo*.

Uno de los modelos más empleados para interpretar las primeras etapas de la formación del cono y desarrollo axónico es el del cultivo de neuronas embrionarias de hipocampo. En este modelo se realizaron importantes descubrimientos relacionados con la reorganización del citoesqueleto, y las cascadas intracelulares que regían estos cambios de plasticidad y morfología. La técnica fue descrita con detalle en un artículo publicado en 1988 en la revista *Nature* por Banker y Goslin, que trabajaban en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Albany en Nueva York. Este artículo abrió las puertas al control de las primeras etapas del desarrollo neural, con posibilidad de ver directamente las diferencias y el efecto sobre las células al sobreexpresar o bloquear determinadas proteínas (Banker & Goslin, 1988).

Esta técnica ha sido ampliamente empleada por muchos autores desde entonces, los cuales han introducido sus mejoras y adaptaciones. En nuestro caso somos deudores del gran conocimiento de esta técnica por el grupo del doctor Juan José Garrido, actualmente en el Instituto Cajal de Madrid. Los animales de partida son embriones de ratón de E17, de los cuales se disecciona el hipocampo y se separan las células con tripsina. Una vez superados los 17 días de desarrollo in útero de los ratones, las neuronas de hipocampo son demasiado maduras para modificarse en cultivo (Garrido *et al.*, 2007). La formación de los circuitos neurales depende inicialmente de establecer dominios bien segregados a modo de compartimentos axónico y dendrítico y la primera gran etapa es la formación de un cono de crecimiento que lleve a la formación del axón y permita su elongación. Esto supone importantes cambios morfológicos y la reorganización coordinada de los citoesqueletos de actina y tubulina. ¿Cuáles son las señales intracelulares, las cascadas de quinasas y fosfatasa que median el proceso y la secuencia

de eventos? Esta es una de las preguntas más complejas de la neurociencia y las respuestas solo se pueden obtener haciendo preguntas simples, fragmentando el problema.

Respecto a la señalización purinérgica en el cono de crecimiento, es necesario decir que es muy abundante y compleja, pero dentro de este entramado había un hecho incontestable: El ATP era capaz de modular negativamente el crecimiento y arborización del axón. La identificación de receptores P2X7 funcionales que mediaban la entrada de calcio hizo que nos planteáramos, ¿cuál era la función fisiológica del P2X7 en el cono de crecimiento? El resultado fue que tratando estas neuronas con antagonistas farmacológicos del receptor, como el Azul Brillante G, BBG; o mediante supresión con RNA de interferencia del P2X7, se produce un incremento de la longitud axonal y de las ramificaciones. Las rutas de señalización intracelulares que median esta respuesta fisiológica dependen del bloqueo o disminución de la actividad de la Ca^{2+} -calmodulina dependiente proteína quinasa II (CaMKII), lo que al final resulta en el incremento de la actividad de la quinasa de adherencia focal (FAK), que a su vez activa la fosfatidil inositol quinasa 3 (PI3K) y la modificación de otras enzimas de la cascada como Akt y sobre todo la Glucógeno sintasa quinasa III (GSK3). Esta última es un verdadero cruce de vías de señalización relacionando supervivencia, diferenciación y apoptosis (Díaz-Hernández *et al.*, 2008).

Los resultados de diferenciación y crecimiento axonal obtenidos en los cultivos de células embrionarias hipocampales, hemos podido reproducirlos en una línea de neuroblastoma humano, N2a. Estas células responden del mismo modo que las neuronas de hipocampo y hemos podido confirmar todos los resultados, incluidas las cascadas de señalización, ampliando el espectro a la caracterización biofísica del receptor P2X7 mediante técnicas de electrofisiología, en colaboración con el grupo del profesor Antonio Rodríguez Artalejo, que es catedrático de farmacología en la Facultad de Veterinaria de la UCM (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2009; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2011).

En el modelo de las neuronas de hipocampo en cultivo hemos demostrado que en las etapas tempranas del desarrollo axonal, el receptor P2X7 está acompañado por el enzima fosfatasa alcalina, el isoenzima no específico de tejido, TNAP, que es muy abundante en el sistema nervioso en desarrollo. Este enzima destruye el ligando ATP con gran eficacia, impidiendo la activación del receptor P2X7. Claramente en el desarrollo de los axones en el cerebro inmaduro, el único modo de librarse del ATP extracelular es metabolizarlo a adenosina y fosfato (Díez-Zaera *et al.*, 2011).

Hemos visto como el receptor P2X7 colocaliza con la fosfatasa alcalina en la etapa temprana del desarrollo. Además de este enzima, el receptor P2X7 está regulado por otra serie de receptores, entre ellos los metabotrópicos de ADP, el P2Y1 y P2Y13. Estos receptores actúan sobre la adenilato ciclasa tipo 5 y modifican citoesqueleto y señalización a través de la proteína quinasa A, PKA, dependiente de AMPcíclico (Del Puerto *et al.*, 2012). El modelo parece ser idóneo para comprender los mecanismos de elonga-

ción axonal, siempre teniendo en cuenta la complejidad del proceso que estamos estudiando.

Hemos añadido algunas piezas nuevas y originales al inmenso rompecabezas de la formación y desarrollo del cono axónico. Estas piezas indican la relevancia del sistema purinérgico y su mecanismo integrado de actuación, elementos que deberán de ser tenidos en cuenta en futuros intentos de reparación de lesiones nerviosas.

9.2. Receptor P2X7 en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas: a) Modelos murinos de la enfermedad de Huntington

La mutación responsable de la Enfermedad de Huntington consiste en una expansión de repeticiones del triplete de bases CAG, cerca del extremo 5' del gen Huntingtina HTT, que codifican para una secuencia de poliglutaminas (poliQ). Inicialmente este gen se denominó IT15, y se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 (región 4p-16.3). Este gen está formado por 67 exones que codifican para una proteína de ~348 kD denominada huntingtina (htt). El gen IT15 se expresa en todos los tejidos, aunque los niveles más altos de expresión se encuentran en cerebro y testículos.

Los individuos sanos poseen entre 11 y 35 repeticiones de CAG, mientras que los enfermos de Huntington tienen más de 39 repeticiones. El número de repeticiones de CAG condiciona la edad de inicio y la severidad de la enfermedad, siendo más severa y comenzando antes cuanto mayor sea la expansión. Así, la forma más común de la enfermedad se produce con 40-50 repeticiones de glutamina, mientras que los alelos que contienen entre 35 y 39 repeticiones están asociados con formas seniles de la enfermedad (en algunos casos no aparece). La aparición de más de 50 repeticiones induce el desarrollo de la forma juvenil de la enfermedad, siendo esta su forma más agresiva. La localización y la formación de acúmulos de la huntingtina mutada es principalmente citoplásmica, aunque también puede detectarse en el núcleo.

La enfermedad de Huntington se engloba dentro de las enfermedades de los ganglios basales, entre las que también se encuentran otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. La neuropatología de la enfermedad de Huntington es sorprendentemente selectiva y se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y atrofia del estriado. En menor medida también se ven afectadas las capas III, V y VI de la corteza motora y en estadios avanzados de la enfermedad el hipocampo, el tálamo o el cerebelo. La atrofia del estriado cursa con pérdida específica de las neuronas GABAérgicas espinosas de tamaño medio (MSSNs, o *medium-sized spiny neurons*), que comprenden el 95% de la población neuronal estriatal.

Existen múltiples modelos que tratan de reproducir la enfermedad de Huntington, una revisión interesante es la de Ferrante (2009). En nuestros estudios en colaboración con el doctor José Javier Lucas del centro de Investigación Severo Ochoa hemos utilizado dos modelos murinos para

tratar de comprender el papel de los receptores presynápticos P2Y y P2X en la enfermedad de Huntington. Los modelos en cuestión han sido el de los ratones R6/1, línea que fue desarrollada por Bates y colaboradores (Bates *et al.*, 1997). Este modelo expresa el exón 1 del gen de la huntingtina mutada con 115 repeticiones del triplete CAG. Hasta los dos meses de edad estos ratones no muestran ningún fenotipo neurológico y tampoco pérdida de neuronas estriatales. El segundo modelo ha sido el de los ratones condicionales Tet/HD94, que expresan el gen mutado con 94 repeticiones del triplete CAG. La regulación del sistema se realiza mediante un trans activador regulado por tetraciclina. Mientras los animales reciben en el agua tetraciclina la huntingtina mutada no se expresa. La descripción completa del modelo y sus ventajas está recogida en la publicación del grupo en la prestigiosa revista *Cell* (Yamamoto *et al.*, 2000).

Utilizando estos modelos demostramos que en los animales modelo de la enfermedad de Huntington los niveles proteicos y la presencia del receptor P2X7 en terminales sinápticas estaban significativamente aumentados. Estos receptores tenían además una respuesta al agonista exacerbada, con mayor entrada de calcio, mayor afinidad por el agonista y más tiempo abiertos, incluso una vez eliminado el agonista. Este comportamiento puede reproducirse en neuronas de corteza motora en cultivo en las cuales se expresa mediante transfección el exón 1 de la huntingtina mutada con un número elevado de repeticiones (Díaz-Hernández *et al.*, 2009).

Pensamos de todo lo anterior que si el incremento de los niveles de P2X7 mediado por la expansión de poliQ era finalmente responsable de la destrucción sináptica y los síntomas motores, el tratamiento con el antagonista del receptor, el BBG, que es además un colorante alimentario podría resultar beneficioso. La hipótesis resultó válida y los animales inyectados intraperitonealmente con BBG, prevenían la pérdida de neuronas, la pérdida de peso y se recuperaba la coordinación motora, analizado mediante el test del Rota-rod (Díaz-Hernández *et al.*, 2009).

El P2X7 ha resultado ser una diana farmacológica excelente para paliar los problemas derivados de la hiperactividad del receptor en las terminales sinápticas. Estos resultados constituyen una patente de uso, para estos y otros antagonistas del P2X7 en el tratamiento de la neurodegeneración.

9.3. Receptor P2X7 en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas: b) Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

Nuestro interés en los modelos experimentales para comprender la enfermedad de Alzheimer surge cuando descubrimos la presencia de la proteína precursora de amiloide, APP, en las células de neuroblastoma humano N2a. Estas células presentan receptores para nucleótidos tanto de la familia metabotrópica, P2Y, como de la ionotrópica P2X, siendo el P2X7 el más abundante.

La proteína APP es procesada proteolíticamente por las secretasas, cuando actúan las β - y γ -secretasa, se produce un péptido amiloidogénico, el péptido β -amiloide ($A\beta$), el principal componente encontrado en las placas seniles de los enfermos de Alzheimer. Otra alternativa es el procesamiento de APP por las α y γ -secretasas, que originan un péptido de menor tamaño, no amiloidogénico, evitando así la formación del péptido $A\beta$. En este modelo la activación del receptor P2X7 lleva a la reducción de la actividad α -secretasa en las células de origen neural Neuro-2a. Por el contrario, la activación del receptor P2Y2 activa el enzima, inclinándolo el procesamiento hacia el péptido no amiloidogénico. Nuestros estudios sugerían que los antagonistas del receptor P2X7 y los agonistas del P2Y2 son dianas muy prometedoras en la enfermedad de Alzheimer.

Los estudios realizados con cultivos pueden orientar en temas complejos, pero es necesario otro tipo de modelos donde se pueda validar la hipótesis. En este caso concreto teníamos un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer familiar, que es accesible en el catálogo de Jackson. Este modelo, no es otro que el de los ratones J20. En este modelo transgénico que expresa dos mutaciones humanas de la proteína APP, que causan indefectiblemente Alzheimer hereditario temprano, además de la propia APP murina, la inhibición *in vivo* del receptor P2X7 reduce el número de placas de amiloide en el hipocampo, que es la primera zona donde se acumulan y son evidentes las placas. Esta reducción se correlaciona con una disminución en la actividad enzimática de la glucógeno sintasa quinasa-3 en los ratones J20, que a su vez incrementa la actividad de la α -secretasa resultando un procesamiento de la APP hacia los péptidos más pequeños, no amiloidogénicos. Los datos *in vivo* demuestran por vez primera el potencial terapéutico de los antagonistas del receptor P2X7 en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer familiar. Queda una parte muy importante y es encontrar agonistas del receptor P2Y2 que sean activos por vía oral, para así poder incidir doblemente en el procesamiento de APP, pero por el momento no existe ninguno (Díaz-Hernández *et al.*, 2012).

10. DE HOMBRES Y RATONES: Y DE PECES, MOSCAS Y GUSANOS

En las páginas de este discurso he querido rendir homenaje a los numerosos modelos de investigación en ciencias de la vida. Nuestro conocimiento se basa en la observación y los avances siempre requieren de un modelo experimental. Los que trabajamos en el laboratorio somos conscientes de la deuda contraída con tantos investigadores que buscaron con ahínco los modelos más idóneos y entre todo el reino animal aquellos que podían sernos más útiles.

Los ensayos *in vitro* para estudiar interacciones químicas y efectos de receptores y enzimas han dado paso a los cultivos celulares. Disponemos de amplios catálogos de células inmortalizadas o de líneas tumorales que nos pueden dar información muy valiosa para comprender la respuesta y los mecanismos intracelulares. Dentro de estos estudios la utilización de cultivos primarios nos ha proporcionado datos todavía mas útiles para entrever las posibilidades de su utilidad farmacológica y los problemas de su alteración en el individuo completo. Plenamente a favor de las células en cultivo está el hecho de que son un buen modelo para testar las hipótesis, ya que son accesibles a la tecnología de transferencia de genes, sobre expresión de diferentes proteínas y también bloqueo mediante RNA de interferencia de las diversas dianas. La existencia de líneas provenientes de tejidos humanos, o del humano directamente de sus tejidos proliferativos es otra de las técnicas actualmente en boga.

La complejidad del animal entero, los sistemas que lo componen y su funcionamiento coordinado es difícil de lograr en estudios fragmentarios y al final necesitamos los modelos animales. De ahí el encabezamiento de este epígrafe: de hombres y ratones, que alude a la novela del Premio Nobel de Literatura John Steinbeck. Realmente en cada época han primado unos modelos animales sobre otros y de la rata, cobaya, gato o perro de los cuales hemos dejado constancia a lo largo del texto nos hemos ido a los ratones. La posibilidad mediante técnicas de ingeniería genética de modificarlos y deleccionar, expresar o sobreexpresar genes propios, o genes de otras especies, genes funcionales o con las alteraciones de las enfermedades hereditarias han hecho del ratón el compañero ideal en la investigación de las enfermedades.

Los recortes en los proyectos de investigación han agudizado el ingenio, sumado a la oposición de ciertos sectores a utilizar los pequeños mamíferos y actualmente el pez cebra (*Danio rerio*) que es un pequeño

vertebrado, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, están surgiendo con fuerza para realizar los primeros ensayos rápidos de los numerosos compuestos que son analizados de modo rutinario en las compañías farmacéuticas.

La disponibilidad de líneas de *Drosophila* que sobreexpresan proteínas mutadas y sufren neurodegeneración están siendo presentadas como buenos modelos para estudiar las enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer y Huntington. Por añadidura son mucho más fáciles de construir y mucho más baratas que los ratones.

El gusano nematodo *C. Elegans* tiene el encanto de la simplicidad: 1.000 células que tenemos numeradas, estructura transparente, con mecanismos de muerte celular por apoptosis similares a los encontrados en humanos. Su bajo coste y su fácil manipulación están consiguiendo que sea un modelo para analizar los compuestos nuevos diseñados para cáncer, dolor y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer.

El pequeño pez cebra, aunque un poco más costoso, tiene muchas más ventajas, entre ellas que los embriones son transparentes y se desarrollan fuera de sus madres, permitiendo una evaluación directa de diferentes fármacos, sobre los órganos internos, que son homólogos a los humanos y tienen genes también homólogos a los nuestros, ventajas indiscutibles sobre los modelos de *Drosophila* y *C. elegans*.

El futuro, que tendremos que construir nosotros, nos traerá seguramente muchas sorpresas, nuevos modelos de experimentación adaptados para cada patología, pero lo que es realmente importante es que nuestros jóvenes estudiantes de veterinaria y de ciencias afines se sientan protagonistas de un futuro que debe de ser suyo y necesitan conquistarlo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 64(3): 445-75.
- Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A., and Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3): 281-341.
- Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32(1): 19-29.
- Axelsson, J. & Holmberg, B. (1969). The effects of extracellularly applied ATP and related compounds on electrical and mechanical activity of the smooth muscle *taenia coli* from the guinea-pig. *Acta Physiol Scand* 75, 149-156.
- Axelsson, J.; Holmberg, B. & Hoegberg, G. (1965). Some effects of ATP and adrenaline on intestinal smooth muscle. *Life Sci* 4, 817-821.
- Banker, G., and Goslin, K. (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature.* 1988 Nov 10; 336(6195): 185-6.
- Bankston, L. A., and Guidotti, G. (1996). Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* **271**, 17132-17138.
- Bannasch, D.; Safra, N.; Young, A.; Karmi, N.; Schaible, R. S., and Ling, G. V. (2008). Mutations in the SLC2A9 gene cause hyperuricosuria and hyperuricemia in the dog. *PLoS Genet.* 2008 Nov; 4(11): e1000246. Epub 2008 Nov 7.
- Barden, N.; Harvey, M.; Gagné, B.; Shink, E.; Tremblay, M.; Raymond, C.; Labbé, M.; Villeneuve, A.; Rochette, D.; Bordeleau, L.; Stadler, H.; Holsboer, F., and Müller-Myhsok, B. (2006). Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141B(4): 374-82.
- Bates, G. P.; Mangiarini, L.; Mahal, A., and Davies, S. W. (1997). Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 6(10): 1633-7. Review.

- Becker, D.; Woltersdorf, R.; Boldt, W.; Schmitz, S.; Braam, U.; Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2008). The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem.* 283(37): 25725-34.
- Bellocchio, E. E.; Reimer, R. J.; Fremeau, R. T., and Edwards, R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, 289, 957-960.
- Bejanin, S.; Cervini, R.; Mallet, J., and Berrard, S. (1994). A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem.* 269(35): 21944-7.
- Bennett, D. W. & Drury, A. N. (1931). Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. *J Physiol* 72, 28-320.
- Berne, R. M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204, 317-322.
- Blaschko, H.; Born, G.; D’Lorio, A., and Eade, N. R. (1956). Observations on the distribution of catecholamines and adenosine triphosphate in the bovine adrenal medulla. *J. Physiol. (Lond).* **133**, 548-557.
- Björklund, O.; Kahlström, J.; Salmi, P., and Fredholm, B. B. (2008). Perinatal Caffeine, Acting on Maternal Adenosine A₁ Receptors, Causes Long-Lasting Behavioral Changes in Mouse Offspring PLoS ONE. 2008; 3(12): e3977.
- Bradley, H. J.; Baldwin, J. M.; Goli, G. R.; Johnson, B.; Zou, J.; Sivaprasadarao, A.; Baldwin, S. A., and Jiang, L. H. (2011). Residues 155 and 348 contribute to the determination of P2X7 receptor function via distinct mechanisms revealed by single-nucleotide polymorphisms. *J Biol Chem.* 286 (10): 8176-87.
- Brake, A. J.; Wagenbach, M. J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* 371(6497): 519-23.
- Buchthal, F.; Engbaek, L.; Sten-Knudsen, O. & Thomasen, E. (1947). Application of adenosine triphosphate and related compounds to the spinal cord of the cat. *J Physiol* 106, 3.
- Buchthal, F. & Folkow, B. (1948). Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand* 15, 150-160.
- Buell, G. N.; Talabot, F.; Gos, A.; Lorenz, J.; Lai, E.; Morris, M. A., and Antonarakis, S. E. (1998). Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels.* 5(6): 347-54.
- Burnstock, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: R. W. Straub & L. Boils (eds). *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach*, pp. 107-118. Raven Press, New York.
- Burnstock, G. (2007a). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87(2): 659-797. Review.

- (2007b). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007 64(12): 1471-83. Review.
- (2009). Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. *Mol Pain.* 30; 5:69.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 16(5): 433-40. Review.
- Cabrini, G.; Falzoni, S.; Forchap, S. L.; Pellegatti, P.; Balboni, A.; Agostini, P.; Cuneo, A.; Castoldi, G.; Baricordi, O. R., and Di Virgilio, F. (2005). A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol.* 175(1): 82-9.
- Carracedo, G.; Peral, A., and Pintor, J. (2010). Diadenosine polyphosphates in tears of Sjogren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(11): 5452-9.
- Carrasquero, L. M. G.; Delicado, E. G.; Jiménez, A. I.; Pérez-Sen, R., and Miras-Portugal, M. T. (2005). Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y13-like receptors. *Purinergic Signal.* 1(2): 153-159.
- Carrasquero, L. M.; Delicado, E. G.; Bustillo, D.; Gutiérrez-Martín, Y.; Artalejo, A. R., and Miras-Portugal, M. T. (2009). P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem.* 110(3): 879-89.
- Carrasquero, L. M.; Delicado, E. G.; Sánchez-Ruiloba, L.; Iglesias, T., and Miras-Portugal, M. T. (2010). Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia.* 58(8): 984-95.
- Cattaneo, M. (2011). Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost.* 105 Suppl 1: S67-74.
- Chambers, L. J.; Stevens, A. J.; Moses, A. P.; Michel, A. D.; Walter, D. S.; Davies, D. J.; Livermore, D. G.; Fonfria, E.; Demont, E. H.; Vimal, M.; Theobald, P. J.; Beswick, P. J.; Gleave, R. J.; Roman, S. A., and Senger, S. (2010). Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X7 receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 20(10): 3161-4.
- Chaumont, S.; Jiang, L. H.; Penna, A.; North, R. A., and Rassendren, F. (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem.* 279(28): 29628-38.
- Chen, X.; Pierce, B.; Naing, W.; Grapperhaus, M. L., and Phillion, D. P. (2010). Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoropyrimidin-2-yl)benzamide as a potent and CNS penetrable P2X7 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett.* 20(10): 3107-11.
- Ciruela, F.; Gómez-Soler, M.; Guidolin, D.; Borroto-Escuela, D. O.; Agnati, L. F.; Fuxe, K., and Fernández-Dueñas, V. (2011). Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and

- glutamate neurotransmission in the brain. *Biochim Biophys Acta*. 1808(5): 1245-55.
- Cockayne, D. A.; Hamilton, S. G.; Zhu, Q. M.; Dunn, P. M.; Zhong, Y.; Novakovic, S.; Malmberg, A. B.; Cain, G.; Berson, A.; Kassotakis, L.; Hedley, L.; Lachnit, W. G.; Burnstock, G.; McMahon, S. B., and Ford, A. P. (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. 26; 407(6807): 1011-5.
- Collingridge, G. L.; Olsen, R. W.; Peters, J., and Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. 56(1): 2-5.
- Communi, D.; González, N. S.; Detheux, M.; Brézillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M., and Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem*. 276(44): 41479-85.
- Crooke, A.; Guzmán-Aranguéz, A.; Peral, A.; Abdurrahman, M. K., and Pintor, J. (2008). Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacol Ther*. 119(1): 55-73. Review.
- Dale, H. H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 6, 147-190.
- Dale, H. H., and Dudley, H. W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J. Physiol*. 68, 97-123.
- Dale, H. H.; Feldberg, W., and Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol*. 86, 353-380.
- Del Puerto, A.; Díaz-Hernández, J. I.; Tapia, M.; Gómez-Villafuertes, R.; Benítez, M. J.; Zhang, J.; Miras-Portugal, M. T.; Wandosell, F.; Díaz-Hernández, M., and Garrido, J. J. (2012). Adenylate ciclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J. Cell Sci* 2012, in print.
- Deuticke, H. J. (1932). Über den einfluss von adenosin und adenosin-phosphoräuren auf den isolierten meerschweinchenuterus. *Pflugers Arch* 230, 555.
- Devries, M. P.; Vessalo, M.; Galligan, J. J. (2010). Deletion of P2X2 and P2X3 receptor subunits does not alter motility of the mouse colon. *Front Neurosci*. 19; 4:22.
- Díaz-Hernández, M.; Pintor, J., Castro, E.; Miras-Portugal, M. T. (2001). Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci*. 14 (6): 918-26.
- (2002). Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 42(1): 20-33.
- Díaz-Hernández, M.; Cox, J. A.; Migita, K.; Haines, W.; Egan, T. M., and Voigt, M. M. (2002). Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 295(4): 849-53.
- Díaz-Hernández, M.; Sánchez-Nogueiro, J.; Pintor, J., and Miras-Portugal, M. T. (2004). Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther*. 311(3): 954-67.

- Díaz-Hernández, M.; Sánchez-Nogueiro, J., and Miras-Portugal, M. T. (2006). Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci.* 30(1-2): 177-80.
- Díaz-Hernández, M.; Del Puerto, A.; Díaz-Hernández, J. I.; Díez-Zaera, M.; Lucas, J. J.; Garrido, J. J., and Miras-Portugal, M. T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci.* 121 (Pt 22): 3717-28.
- Díaz-Hernández, M.; Díez-Zaera, M.; Sánchez-Nogueiro, J.; Gómez-Villafuertes, R.; Canals, J. M.; Alberch, J.; Miras-Portugal, M. T., and Lucas, J. J. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23(6): 1893-906.
- Díaz-Hernández, J. I.; Gómez-Villafuertes, R.; León-Otegui, M.; Hontecillas-Prieto, L.; Del Puerto, A.; Trejo, J. L.; Lucas, J. J.; Garrido, J. J.; Gualix, J.; Miras-Portugal, M. T., and Díaz-Hernández, M. (2012). *In vivo* P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiol Aging.* Version electronic. 2011 Nov 1. [Epub ahead of print].
- Díez-Zaera, M.; Díaz-Hernández, J. I.; Hernández-Álvarez, E.; Zimmermann, H.; Díaz-Hernández, M., and Miras-Portugal, M. T. (2011). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 22(7): 1014-24.
- Di Virgilio, F. (2003). Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol.* 140(3): 441-3.
- Dowdall, M. J.; Boyne, A. F. & Whittaker, V. P. (1974). Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* 140, 1-12.
- Drury, A. N. (1936). The physiological activity of nucleic acid and its derivatives. *Physiol Rev* 16, 292-325.
- Drury, A. N. & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol* 68, 213-237.
- El Mestikawy, S.; Wallén-Mackenzie, A.; Fortin, G. M.; Descarries, L., and Trudeau, L. E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci.* 12(4): 204-16.
- Embden, G. & Zimmermann, M. (1927). Über die Bedeutung der Adenylsäure für die Muskelfunktion. 1. Mitteilung: Das Vorkommen von Adenylsäure in der Skelettmuskulatur. *Z Physiol Chem* 167, 137-140.
- Ennion, S. J., and Evans, R. J. (2002). P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(3): 611-6.
- Evans, R. J.; Lewis, C.; Buell, G.; Valera, S.; North, R. A., and Surprenant, A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expres-

- sed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol*. 1995 Aug; 48(2): 178-83.
- Fatt, P., and Katz, B. (1952). Spontaneous sub threshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol*. 117, 109-128.
- Feng, Y. H.; Li, X.; Zeng, R., Gorodeski, G. I. (2006). Endogenously expressed truncated P2X7 receptor lacking the C-terminus is preferentially upregulated in epithelial cancer cells and fails to mediate ligand-induced pore formation and apoptosis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25(9-11): 1271-6.
- Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim Biophys Acta*. 1792(6): 506-20.
- Fischer, E. (1881). Über das Caffein. *Ber deut chem Ges* 14, 637-644.
- (1907). Untersuchungen in der Puringruppe. Springer, Berlin.
- Fiske, C. H. & SubbaRow, Y. (1929). Phosphorous compounds of muscle and liver. *Science* 70, 381-382.
- Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J. Biol. Chem*. **274**, 12951-12954.
- Fredholm, B. B. (2003). Caffeine and the biological role of adenosine receptors. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69: 4, 18-36.
- Freund, H. (1920). Über die pharmakologischen wirkungendes defibrinirten blutes. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 86, 267.
- Fumagalli, M.; Brambilla, R., D'Ambrosi, N.; Volonté, C.; Matteoli, M.; Verderio, C., and Abbraccio, M. P. (2003). Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia*. 43(3): 218-03.
- Gaddum, J. H. & Holtz, P. (1933). The localization of the action of drugs on the pulmonary vessels of dog and cats. *J Physiol*, 77, 139-158.
- Gargett, C. E., and Wiley, J. S. (1997). The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol*. 120(8): 1483-90.
- Garrido, J. J.; Simón, D.; Varea, O., and Wandosell, F. (2007). GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett*. 581 (8): 1579-86.
- Gerlach, E.; Deuticke, B. & Orgisback, R. H. (1963). Der nucleotidabbau im hertzmuskel bei sauerstoffmanger und seine mögliche bedeutung für die coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50, 228-229.
- Ginsborg, B. L. & Hirst, G. D. (1972). The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol* 224, 629-645.
- Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J., and Miras-Portugal, M T. (2001). Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem*. 77(1): 84-93.
- Gómez-Villafuertes, R.; Del Puerto, A.; Díaz-Hernández, M.; Bustillo, D.; Díaz-Hernández, J. I.; Huerta, P. G.; Artalejo, A. R.; Garrido,

- J. J., and Miras-Portugal, M. T. (2009). Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J.* 276(18): 5307-25.
- Gonzales, E. B.; Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature.* 460(7255): 599-604.
- Gordon, J. L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J.* 233, 309-319.
- Green, H. N. & Stoner, H. B. (1950). Biological Actions of Adenine Nucleotides. H. K. Lewis & Co, London.
- Gualix, J.; Abal, M.; Pintor, J.; García-Carmona, F., and Miras-Portugal, M. T. (1996). Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1957-1965.
- Gualix, J.; Fideu, M. D.; Pintor, J.; Rotllán, P.; García-Carmona, F., and Miras-Portugal, M. T. (1997). Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB*, **11**: 981-990.
- Gualix, J.; Álvarez, A. M.; Pintor, J., and Miras-Portugal, M. T. (1999a). Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent e-ATP and granular size increase induced by ATP. *Receptors and Channels*, **6**, 449-461.
- Gualix, J.; Pintor, J., and Miras-Portugal, M. T. (1999b). Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 73, 1098-1104.
- Gualix J.; Gómez-Villafuertes, R.; Díaz-Hernández, M.; Miras-Portugal, M. T. (2003). Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem.* 87(1): 160-71.
- Guo, C.; Masin, M.; Qureshi, O. S., and Murrell-Lagnado, R. D. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 72(6): 1447-56.
- Gutiérrez-Martín, Y.; Bustillo, D.; Gómez-Villafuertes, R.; Sánchez-Nogueiro, J.; Torregrosa-Hetland, C.; Binz, T.; Gutiérrez, L. M.; Miras-Portugal, M. T., and Artalejo, A. R. (2011). P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 286(13): 11370-81.
- Hervás, C.; Pérez-Sen, R., and Miras-Portugal, M. T. (2005). Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol.* 70(5): 770-85.
- Haines, W. R.; Migita, K.; Cox, J. A.; Egan, T. M., and Voigt, M. M. (2001). The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem.* 276(35): 32793-8.
- Hillarp, N. A.; Hogberg, B., and Nilson, B. (1955). Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow. *Nature* **176**, 1032-1033.

- Höglund, P. J.; Nordström, K. J.; Schiöth, H. B., and Fredriksson, R. (2011). The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol Biol Evol.* 28(4): 1531-41.
- Hollopeter, G.; Jantzen, H. M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnan, V.; Yang, R. B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D., and Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 409(6817): 202-7.
- Holmsen, H., and Weiss, H. J. (1979). Secretable storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* 30, 119-134.
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145, 494-504.
- Holton, F. A. & Holton, P. (1954). The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* 126, 124-140.
- Honore, P.; Donnelly-Roberts, D.; Namovic, M. T.; Hsieh, G.; Zhu, C. Z.; Mikusa, J. P.; Hernández, G.; Zhong, C.; Gauvin, D. M.; Chandran, P.; Harris, R.; Medrano, A. P.; Carroll, W.; Marsh, K.; Sullivan, J. P.; Faltynek, C. R., and Jarvis, M. F. (2006). A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(3): 1376-85.
- Houck, C. R.; Bing, R. J.; Craig, F. N. & Visscher, F. E. (1948). Renal hyperemia after the intravenous infusion of adenylic acid adenosine, or adenosine-triphosphate in the dog. *Am J Physiol* 153, 159-168.
- Humphreys, B. D.; Virginio, C.; Surprenant, A.; Rice, J., and Dubyak, G. R. (1998). Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol.* 54(1): 22-32.
- Husted, S., and van Giezen, J. J. (2009). Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y12 receptor antagonist. *Cardiovasc Ther.* 27(4): 259-74.
- Incho, E. W.; Cook, A. K.; Imig, J. D.; Vial, C., and Evans, R. J. (2003). Physiological role for P2X1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior. *J Clin Invest.* 112(12): 1895-905.
- Jacobson, K. A. (2009). Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009 (193): 1-24. Review.
- Kalckar, H. M. (1947a). Differential spectrometry of purine compounds by means of specific enzymes; determination of hydroxypurine compounds. *J Biol Chem* 167, 429-443.
- (1947b). Differential spectrometry of purine compounds by means of specific enzymes; determination of adenine compounds. *J Biol Chem* 167, 445-459.
- Kalckar, H. M. & Lowry, O. H. (1947). The relationship between traumatic shock and the release of adenylic acid compounds. *Am J Physiol* 149, 240-245.

- Kawate, T.; Michel, J. C.; Birdsong, W. T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*. 460(7255): 592-8.
- Khakh, B. S., and North, R. A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 527-532. 4427102.
- Khakh, B. S.; Smith, W. B.; Chiu, C. S.; Ju, D.; Davidson, N., and Lester, H. A. (2001). Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X2-green fluorescent protein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(9): 5288-93.
- Lane, J. R.; Jaakola, V. P., and Ijzerman, A. P. (2011). The structure of the adenosine receptors: implications for drug discovery. *Adv Pharmacol*. 61: 1-40. Review.
- Lankford, A. R.; Yang, J. N.; Rose Meyer, R.; French, B. A.; Matherne, G. P.; Fredholm, B. B., and Yang, Z. (2006). Effect of modulating cardiac A1 adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4): H1469-73.
- Larsson, M.; Sawada, K.; Morland, C.; Hiasa, M.; Ormel, L.; Moriyama, Y., and Gundersen, V. (2011). Functional and Anatomical Identification of a Vesicular Transporter Mediating Neuronal ATP Release. *Cereb Cortex*. 2011 Aug 1. En versión electronic.
- Lazarowski, E. (2006). Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells. *Novartis Found Symp*. 2006; 276: 73-84; discussion 84-90, 107-12, 275-81. Review.
- Lazarowski, E. R.; Sesma, J. I.; Seminario-Vidal, L., and Kreda, S. M. (2011). Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv Pharmacol*. 2011; 61: 221-61.
- Lechner, S. G., and Boehm, S. (2004). Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic Signal*. 1(1): 31-41.
- León, D.; Hervás, C., and Miras-Portugal, M. T. (2006). P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci*. 23(11): 2999-3013.
- León, D.; Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P., and Miras-Portugal, M. A. (2008). Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*. 52(6): 1148-59.
- León-Otegui, M.; Gómez-Villafuertes, R.; Díaz-Hernández, J. I.; Díaz-Hernández, M.; Miras-Portugal, M. T., and Gualix, J. (2011). Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on α -secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS Lett*. 585(14): 2255-62.
- Lesch, M., and Nyhan, W. L. (1964) A familial disorder of Uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med*. 36: 561-70.
- Lipman, F. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1, 99-162.
- Liu, X.; Surprenant, A.; Mao, H. J.; Roger, S.; Xia, R.; Bradley, H., and Jiang, L. H. (2008). Identification of key residues coordinating function-

- nal inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol.* 73(1): 252-9.
- Loewi, O. (1921). On the humoral transmission from nerve to the heart I. Communication. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 189, 239-242.
- (1949). On the antagonism between pressor and depressor agents in the frog's heart. *J Pharmacol Exp Ther* 96, 295-304.
- Loewi, O., and Navratil, E. (1926a). On the humoral transmission from nerve to the heart X. Communication. On the fate of the Vagusstoff. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 214, 678-688.
- Loewi, O., and Navratil, E. (1926b). On the humoral transmission from nerve to the heart XI. Communication. On the mechanism of physostigmin and ergotamin on the vagus nerve. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 214, 689-696.
- Lohmann, K. (1929). Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 17, 624-625.
- Londos, C.; Cooper, D. M.; Schlegel, W. & Rodbell, M. (1978). Adenosine analogs inhibit adipocyte adenylate cyclase by a GTP-dependent process: basis for actions of adenosine and methylxanthines on cyclic AMP production and lipolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 5362-5366.
- Londos, C.; Cooper, D. M. & Wolff, J. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 2551-2554.
- Lopes, L. V.; Halldner, L.; Rebola, N.; Johansson, B.; Ledent, C.; Chen, J. F.; Fredholm, B. B., and Cunha, R. A. (2004). Binding of the prototypical adenosine A_{2A} receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A₁ and A_{2A} receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 141(6): 1006-1014.
- López-Zapata, A.; León, D.; Castillo, C. A.; Albasanz, J. L., and Martín, M., Maternal glutamate intake during gestation and lactation regulates adenosine A(1) and A(2A) receptors in rat brain from mothers and neonates. *Neuroscience*. 2011 Sep 29 [Epub ahead of print].
- Lorenzo, A. M.; León, D.; Castillo, C. A.; Ruiz, M. A.; Albasanz, J. L., and Martín, M. (2010). Maternal caffeine intake during gestation and lactation down-regulates adenosine A1 receptor in rat brain from mothers and neonates. *J Neurosci Res.* 2010 May 1; 88(6): 1252-61.
- Luqmani, Y. A. (1981). Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience*. 6, 1011-1021.
- Lustig, K. D.; Shiau, A. K.; Brake, A. J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(11): 5113-7.
- Lüthje, J., and Ogilvie, A. (1983). The presence of diadenosine 5'.5'''-P1,P3-triphosphate (Ap3A) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115: 253-260.
- Madinaveitia, J. & Raventos, J. (1949). Antimalarial compounds as antagonists of adenosine. *Br J Pharmacol Chemother* 4, 81-92.

- Marín-García, P.; Sánchez-Nogueiro, J.; Gómez-Villafuertes, R.; León, D., and Miras-Portugal, M. T. (2008). Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience*. 151(2): 361-73.
- Marteau, F.; Le Poul, E.; Communi, D.; Labouret, C.; Savi, P.; Boeynaems, J. M., and González, N. S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol Pharmacol*. 64(1): 104-12.
- Masin, M.; Young, C.; Lim, K.; Barnes, S. J.; Xu, X. J.; Marschall, V.; Brutkowski, W.; Mooney, E. R.; Gorecki, D. C., and Murrell-Lagnado, R. (2012). Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: Re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug 12. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x. [Epub ahead of print].
- Mediero, A.; Guzmán-Aranguez, A.; Crooke, A.; Peral, A., and Pintor, J. (2008). Corneal re-epithelialization stimulated by diadenosine polyphosphates recruits RhoA/ROCK and ERK1/2 pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49(11): 4982-92.
- Michel, A. D.; Chambers, L. J.; Clay, W. C.; Condreay, J. P.; Walter, D. S., and Chessell, I. P. (2007). Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol*. 151(1): 103-14.
- Michelson, A. D. (2009). New P2Y12 antagonists. *Curr Opin Hematol*. 16(5): 371-7.
- Miñana, M. D., Portolés, M.; Jordá, A., and Grisolia, S. (1984). Lesch-Nyhan syndrome, caffeine model: increase of purine and pyrimidine enzymes in rat brain. *J Neurochem*. 1984, 43(6): 1556-60.
- Miras-Portugal, M. T.; Díaz-Hernández, M.; Giráldez, L.; Hervás, C.; Gómez-Villafuertes, R.; Sen, R. P.; Gualix, J., and Pintor, J. (2003).
- Moore, D. J.; Chambers, J. K.; Wahlin, J. P.; Tan, K. B.; Moore, G. B.; Jenkins, O.; Emson, P. C., and Murdock, P. R. (2001). Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta*. 1521(1-3): 107-19.
- Moore, D.; Iritani, S.; Chambers, J., and Emson, P. (2000). Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2000 Nov 27; 11(17): 3799-803.
- Moriyama, Y., and Nelson, N. (1987). The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *J. Biol. Chem*. 262, 9175-9180.
- Mueller, K.; Saboda, S.; Palmour, R., and Nyhan, W. L. (1982). Self-injurious behavior produced in rats by daily caffeine and continuous amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 17(4): 613-7.
- Mulryan, K.; Gitterman, D. P.; Lewis, C. J.; Vial, C.; Leckie, B. J.; Cobb, A. L.; Brown, J. E.; Conley, E. C.; Buell, G.; Pritchard, C. A., and Evans, R. J. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature*. 403 (6765): 86-9.

- Nakazawa, K.; Sawa, H.; Ojima, H.; Ishii-Nozawa, R.; Takeuchi, K., and Ohno, Y. (2002). Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca(2+) block of P2X(2) receptor. *Eur J Pharmacol*, 449(3): 207-11.
- Nelson, D. W.; Sarris, K.; Kalvin, D. M.; Namovic, M. T.; Grayson, G.; Donnelly-Roberts, D. L.; Harris, R.; Honore, P.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R., and Carroll, W. A. (2008). Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbonylhydrazide P2X7 antagonists. *J Med Chem*. 51(10): 3030-4.
- Nicke, A.; Bäumer, H. G.; Rettinger, J.; Eichele, A.; Lambrecht, G.; Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*. 17(11): 3016-28.
- Nicke, A.; Kuan, Y. H.; Masin, M.; Rettinger, J.; Márquez-Klaka, B.; Bender, O.; Górecki, D. C.; Murrell-Lagnado, R. D., and Soto, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem*. 284(38): 25813-22.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 82(4): 1013-67.
- Nückel, H.; Frey, U. H.; Dürig, J.; Dührsen, U., and Siffert, W. (2004). 1513A/C polymorphism in the P2X7 receptor gene in chronic lymphocytic leukemia: absence of correlation with clinical outcome. *Eur J Haematol*. 72(4): 259-63.
- O'Connor, S. E.; Dainty, I. A. & Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci* 12, 137-141.
- Ortega, F.; Pérez-Sen, R., and Miras-Portugal, M. T. (2008). Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem*. 104(1): 62-73.
- Ortega, F.; Pérez-Sen, R.; Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (2009). P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox Res*. 15(3): 193-204.
- Ortega, F.; Pérez-Sen, R.; Morente, V.; Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (2010). P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*. 67(10): 1723-33.
- Ortega, F.; Pérez-Sen, R.; Delicado, E. G., and Teresa Miras-Portugal, M. (2011). ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*. 61(8): 1210-21.
- Peral, A.; Carracedo, G.; Acosta, M. C.; Gallar, J., and Pintor, J. (2006). Increased levels of diadenosine polyphosphates in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006, 47(9): 4053-8.
- Pintor, J., and Miras-Portugal, M. T. (1995). A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 895-902.

- Pintor, J., and Miras-Portugal, M. T. (2000). Receptors for diadenosine polyphosphates P2D, P2YAPNA, P4 and dinucleotide receptors: are there too many? *TIPS*, **21**, 135.
- Pintor, J.; Torres, M., and Miras-Portugal, M. T. (1991a). Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates —Ap4A and Ap5A— from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci.*, **48**: 2317-2324.
- Pintor, J.; Torres, M.; Castro, E., and Miras-Portugal, M. T. (1991b). Characterization of diadenosine tetraphosphate Ap4A binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P2Y site. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1980-1984.
- Pintor, J.; Díaz-Rey, M. A.; Torres M., and Miras-Portugal, M. T. (1992a). Presence of diadenosine polyphosphates -Ap4A and Ap5A- in rat brain synaptic terminals. 78 dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.*, **136**: 114-144.
- Pintor, J.; Kowalewsky, H. J.; Torres, M.; Miras-Portugal, M. T., and Zimmermann, H. (1992b). Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the Torpedo electric organ. *Neurosci. Res. Commun.*, **10**: 9-15.
- Pintor, J.; Rotllán, P.; Torres, M., and Miras-Portugal, M. T. (1992c). Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal. Biochem.* **200**, 296-300.
- Pintor, J.; Díaz-Rey, M. A. and Miras-Portugal, M. T. (1993). Ap4A and ADP- β -S binding to P2-purinergic receptors present on rat brain synaptic terminals. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 1094-1099.
- Pintor J.; Porras, A.; Mora, F., and Miras-Portugal, M. T. (1993a). Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates —Ap4A and Ap5A— from caudate putamen of conscious rat. *Neurosci Lett.* **150**(1): 13-6.
- (1995). Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates —Ap4A and Ap5A— from neostriatum of the conscious rat. *J. Neurochem.*, **64**: 670-676.
- Pintor, J.; King, B. F.; Miras-Portugal, M. T., and Burnstock, G. (1996). Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X2 and P2Y1 purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 1-7.
- Pintor, J.; Gualix, J., and Miras-Portugal, M. T. (1997a). Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor. *Mol. Pharmacol.*, **51**: 277-284.
- (1997b). Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (protein kinases A and C) and protein phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem.*, **68**: 2552-2557.
- Pintor, J.; Puche, J. A.; Gualix, J.; Hoyle, C. H. V., and Miras-Portugal, M. T. (1997c). Diadenosine polyphosphates evoke Ca²⁺ transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP. *J. Physiol.*, **504**: 327-335.

- Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T., and Fredholm B. B. (2000). Research on purines and their receptors comes of age. TIPS, December.
- Porter, T. R.; Adolphson, M.; High, R. R.; Smith, L. M.; Olson, J.; Erdkamp, M.; Xie, F.; O'Leary, E.; Wong, B. F.; Eifert-Rain, S.; Hagen, M. E.; Abdelmoneim, S. S., and Mulvagh, S. L. (2011). Rapid detection of coronary artery stenoses with real-time perfusion echocardiography during regadenoson stress. *Circ Cardiovasc Imaging*. 4(6): 628-35.
- Portolés, M.; Miñana, M. D.; Jordá, A., and Grisolia, S. (1985). Caffeine-induced changes in the composition of the free amino acid pool of the cerebral cortex. *Neurochem Res*. 1985 10(7): 887-95.
- Rahman, O. A.; Sasvari-Szekely, M.; Szekely, A.; Faludi, G.; Guttman, A., and Nemoda, Z. (2010). Analysis of a polymorphic microRNA target site in the purinergic receptor P2RX7 gene. *Electrophoresis*. 31(11): 1790-5.
- Rettinger, J., and Schmalzing, G. (2004). Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor. *J Biol Chem*. 279(8): 6426-33.
- Rettinger, J., and Schmalzing, G. (2003). Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol*. 121(5): 451-61.
- Ricard, J., and Cornish-Bowden, A. (1987). Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur. J. Biochem*. **166**, 255-272.
- Ricard, J.; Buc, J., and Meunier, J.-C. (1977). Enzyme memory. 1. A transient kinetic study of wheat-germ hexokinase L1. *Eur. J. Biochem*. **80**, 581-592.
- Ribeiro, J. A. & Walker, J. (1975). The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol*, 54, 213-218.
- Ribeiro, A. S.; Fernandes, V. S.; Orensanz, L. M.; Martínez, M. P.; Recio, P.; Martínez-Sáenz, A.; Climent, B.; Arteaga, J. L.; García-Sacristán, A.; Prieto, D., and Hernández, M. (2011). Mechanisms involved in the adenosine-induced vasorelaxation to the pig prostatic small arteries. *Purinergic Signal*. 7(4): 413-25.
- Roberts, J. A.; Vial, C.; Digby, H. R.; Agboh, K. C.; Wen, H.; Atterbury-Thomas, A., and Evans, R. J. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*. 452(5): 486-500.
- Rodríguez-Candela, J. L. & García-Fernandez, M. C. (1963). Stimulation of secretion of insulin by adenosine-triphosphate. *Nature* 197, 1210.
- Rodríguez del Castillo, A.; Torres, M.; Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (1988). Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates —Ap4A and Ap5A— in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem*. 51: 1696-703.
- Roger, S.; Mei, Z. Z.; Baldwin, J. M.; Dong, L.; Bradley, H.; Baldwin, S. A.; Surprenant, A., and Jiang, L. H. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res*. 44(6): 347-55.

- Rothman, H. (1930). Der Einfluss der Adenosinphosphorsäure auf die Hertzstätigkeit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Path Pharmacol* 155, 129-138.
- Safra, N., Ling, G. V.; Schaible, R. H., and Bannasch, D. L. (2005). Exclusion of urate oxidase as a candidate gene for hyperuricosuria in the Dalmatian dog using an interbreed backcross. *J Hered.* 2005; 96(7): 750-4.
- Sagné, C.; El Mestikawy, S.; Isambert, M. F.; Hamon, M.; Henry, J. P.; Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417(2): 177-83.
- Saier, M. H. Jr. M. (1999). A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J Cell Biochem. Suppl.* 32-33: 84-94.
- Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P., and Miras-Portugal, M. T. (2005). Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett.* 579(17): 3783-8.
- Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P.; León, D.; León-Otegui, M.; Salas, E.; Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J., and Miras-Portugal, M. T. (2009). Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem Int.* 55(7): 671-82.
- Sawada, K.; Echigo, N.; Juge, N.; Miyaji, T.; Otsuka, M.; Omote, H.; Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(15): 5683-6.
- Schlüter, H.; Offers, E.; Brüggemann, G.; van der Giet, M.; Tepel, M.; Nordhoff, E.; Karas, M.; Spieker, C.; Witzel, H., and Zidek, W. (1994). Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* **367**, 186-188.
- Seminarios (1968). Seminars on Lesch-Nyhan syndrome. Discussion of unanswered questions. *Fed Proc.* 1968 Jul-Aug; 27(4): 107-12.
- Simonsen, U.; García-Sacristán, A., and Prieto, D. (1997). Involvement of ATP in the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission of lamb isolated coronary small arteries. *Br J Pharmacol.* 120(3): 411-20.
- Soto, D.; Pintor, J.; Peral, A.; Gual, A., and Gasull, X. (2005). Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005, 314(3): 1042-51.
- Sperlágh, B.; Zsilla, G.; Baranyi, M.; Illes, P., and Vizi, E. S. (2007). Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus. *Neuroscience.* 149(1): 99-111.
- Sreedharan, S.; Shaik, J. H.; Olszewski, P. K.; Levine, A. S.; Schiöth, H. B., and Fredriksson, R. (2010). Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics.* 8; 11:17.
- Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R. A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 272(5262): 735-8.

- Thunberg, U.; Tobin, G.; Johnson, A.; Söderberg, O.; Padyukov, L.; Hultdin, M.; Klareskog, L.; Enblad, G.; Sundström, C.; Roos, G., and Rosenquist, R. (2002). Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 360(9349): 1935-9.
- Trochu, J. N.; Zhao, G.; Post, H.; Xu, X.; Belardinelli, L.; Belloni, F. L., and Hintze, T. H. (2003). Selective A2A adenosine receptor agonist as a coronary vasodilator in conscious dogs: potential for use in myocardial perfusion imaging. *J Cardiovasc Pharmacol*. 41: 132-9.
- Vacca, F.; Giustizieri, M.; Ciotti, M. T.; Mercuri, N. B., and Volonté, C. (2009). Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X receptor. *J Neurochem*. 109(4): 1031-41.
- Vacca, F.; Amadio, S.; Sancesario, G.; Bernardi, G., and Volonté, C. (2004). P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res*. 76(5): 653-61.
- Valera, S.; Hussy, N.; Evans, R. J.; Adami, N.; North, R. A.; Surprenant, A., and Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. 371(6497): 516-9.
- van Calker, D.; Muller, M. & Hamprecht, B. (1978). Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276, 839-841.
- (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33, 999-1005.
- Virginio, C.; Church, D.; North, R. A., and Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 36(9): 1285-94.
- Vitart, V.; Rudan, I.; Hayward, C.; Gray, N. K.; Floyd, J.; Palmer, C. N.; Knott, S. A.; Kolcic, I.; Polasek, O.; Graessler, J.; Wilson, J. F.; Marinaki, A.; Riches, P. L.; Shu, X.; Janicijevic, B.; Smolej-Narancic, N.; Gorgoni, B.; Morgan, J.; Campbell, S.; Biloglav, Z.; Barac-Lauc, L.; Pericic, M.; Klaric, I. M.; Zgaga, L.; Skaric-Juric, T.; Wild, S. H.; Richardson, W. A.; Hohenstein, P.; Kimber, C. H.; Tenesa, A.; Donnelly, L. A.; Fairbanks, L. D.; Aringer, M.; McKeigue, P. M.; Ralston, S. H.; Morris, A. D.; Rudan, P.; Hastie, N. D.; Campbell, H., and Wright, A. F. (2008). SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet*. 2008 Apr; 40(4): 437-42.
- von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 110(3): 415-32. Review.
- Warashina, A. (1985). Changes in the size of isolated chromaffin granules in ATP-evoked catecholamine release. *FEBS Lett*. 184: 87-9.
- Watts, D. T. (1953). Stimulation of uterine muscle by adenosine triphosphate. *Am J Physiol* 173, 291-296.
- Webb, T. E.; Simon, J.; Krishek, B. J.; Bateson, A. N.; Smart, T. G.; King, B. F.; Burnstock, G., and Barnard, E. A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*. 324(2): 219-25.

- Weber, A., and Winkler, H. (1981). Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **6**, 2269-2276.
- Wedd, A. M. & Drury, A. N. (1934). The action of certain nucleic acid derivatives on the coronary flow in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* **50**, 157-164.
- Whittaker, V. P., and Sheridan, M. N. (1964). The morphology and acetylcholine content of isolated cerebral cortical synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **12**, 363-372.
- Wiley, J. S.; Dao-Ung, L. P.; Gu, B. J.; Sluyter, R.; Shemon, A. N.; Li, C.; Taper, J.; Gallo, J., and Manoharan, A. (2002). A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet.* **359**(9312): 1114-9.
- Wu, C. L., and Melton, D. W. (1993). Production of a model for *Lesch-Nyhan syndrome* in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nat Genet.* **1993**; **3**(3): 235-40.
- Yamamoto, A.; Lucas, J. J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell.* **101**(1): 57-66.
- Yang, J-N. (2008). Tesis Doctoral. Título: Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors: Studies using genetically modified mice. Karolinska Institutet. Department of Molecular Medicine and Surgery.
- Yang, J.; Wang, Y.; García-Roves, P.; Björnholm, M., and Fredholm, B. B. (2010). Adenosine A₃ receptors regulate heart rate, motor activity and body temperature. *Acta Physiol (Oxf).* **199**(2): 221-230.
- Young, M. T.; Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2007). Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol.* **71**(1): 92-100.
- Yu, Y.; Ugawa, S.; Ueda, T.; Ishida, Y.; Inoue, K.; Kyaw Nyunt, A.; Umemura, A.; Mase, M.; Yamada, K., and Shimada, S. (2008). Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* **15**; **1194**: 45-55.
- Zimmermann, H. (1978). Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ. *Neuroscience* **3**, 827-836.
- Zimmermann, H., and Denston, C. R. (1976). Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Brain Res.* **111**, 365.
- Zimmermann, H. (2011). Purinergic signaling in neural development. *Semin Cell Dev Biol.* **22**(2): 194-204.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN
POR EL
EXCMO. SR. D. ARTURO RAMÓN ANADÓN NAVARRO
ACADÉMICO DE NÚMERO, PRESIDENTE DE LA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS

Excmo. Sr. Presidente de esta RACV

Excmas. Sras. Académicas y Excmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores:

Mis primeras palabras tienen que ser para expresar mi agradecimiento por la confianza que me ha otorgado la Real Academia de Ciencias Veterinarias de representarla y hacer el *laudatio* y contestación a su discurso, en esta sesión solemne de recepción y toma de posesión de una nueva académica de número, la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Académica de Numero de la Real Academia Nacional de Farmacia y Presidenta de la misma, quien viene a ocupar la medalla n.º 44 de Ciencias Afines, ocupada antes de pasar a la situación de «Académico Supernumerario» por el Excmo. Sr. D. Narciso Luis Murillo Ferrol, Doctor en Medicina, Catedrático y Rector de la Universidad de Zaragoza, a quien hoy tributamos un emocionado recuerdo y deseos de una buena salud.

La presentación de su ingreso en la Real Academia de Ciencias Veterinarias para mí es un honor importante y motivo de entrañable satisfacción y coincide con mi nombramiento de Presidente de esta Real Academia, lo que me orgullece no solo porque la Dra. Teresa Miras Portugal forma parte del cuadro académico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, sino también porque nuestra amistad se ha tejido a través de los años, fruto de su prudencia, sensatez, sensibilidad y colaboración. Además, hoy hubiera sido un día de felicidad para nuestro antecesor en el cargo, el Excmo. Sr. D. Carlos Luis de Cuenca y Esteban, que tanto luchó por abrir la Real Academia a profesionales de otras ciencias afines y en la incorporación de nuevas mujeres como Académicas y por ello quiero dedicarle un tributo de admiración y reconocimiento en este momento tan importante de contestación al ingreso de la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal.

La incorporación de la Dra. María Teresa Miras Portugal a esta Real Academia supone un buen activo por sus magníficas cualidades humanas, intelectuales y científicas. Conozco desde hace mucho tiempo el perfil profesional y la brillante carrera académica de la Dra. Miras Portugal. Su agudeza intelectual hacia lo constructivo, su buen bagaje académico y científico, su prodigiosa capacidad de trabajo unido a su creatividad, y su dedicación a su trabajo, han sido las cualidades principales de la Dra. Miras Portugal para situarse entre los líderes españoles e internacionales en el

campo de la Neurociencia. Es por ello, que este es un día gozoso para la Academia, ya que siempre el ingreso de nuevos académicos ayuda a que esta Docta Institución sea más dinámica, innovadora y más adulta en cuanto al número de especialistas que la mejoran en calidad y en excelencia.

Es tradición en estos actos de recepción y toma de posesión en las Reales Academias presentar los méritos de nuestro recipiendario y hacer una glosa de su discurso de ingreso que acaban de escuchar.

La Profesora Miras Portugal nació en Carballiño de la provincia de Orense, el 20 de febrero de 1948, donde reside durante algunos años. Los primeros estudios los hace en su tierra natal hasta 4.º de bachiller y revalida. El bachillerato superior, 5.º, 6.º y Preuniversitario los cursa en Santiago de Compostela y se orienta hacia la rama de ciencias. Una vez finalizado el Preuniversitario inicia sus estudios universitarios en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago en la que obtuvo un puesto de alumna interna en la asignatura de Química Inorgánica, experiencia que le marcaría su vocación universitaria. En esta Universidad permanece varios años, pero sus miras futuras le hacen que cambie de distrito universitario y termine en el curso académico 1968-1969 sus estudios de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid, obteniendo en el año 1970 el grado de Licenciado en Farmacia por la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid con la calificación de sobresaliente y premio extraordinario de Licenciatura e igualmente el Premio Nacional Fin de Carrera de Farmacia. Nada más acabar su Licenciatura se integra en el Departamento de Bioquímica de la misma Facultad, cuyo Director por aquel entonces era el Profesor Ángel Santos Ruiz, Catedrático, Académico, prestigioso investigador y creador de una excelente escuela de profesores e investigadores dedicados a la bioquímica; la impronta del Dr. Santos Ruiz en María Teresa fue definitiva y debe considerársela su discípula. Desde aquel momento se puede decir que se despierta su vocación científica e investigadora; obtuvo una Beca del Colegio de Farmacéuticos de Madrid (1970-71) e inicia su primer periodo de investigación sobre la «glutamina sintetasas», con idea en un futuro de realizar su Tesis Doctoral. En este periodo obtuvo una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (1971-74), beca obtenida por su magnífico expediente académico, beca que disfrutó durante cuatro años en el Centro de Neuroquímica perteneciente al Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Strasbourg (capital y principal urbe de la Alsacia, a la vez que capital del Departamento del Bajo Rin); durante este tiempo recibe además ayudas de la Fundación Juan March y del Ministerio de Asuntos Exteriores francés. Estos años en el CNRS fortalecieron su vocación investigadora en el campo de la «Neurociencia». En esta estancia en el extranjero, que fue muy fructífera, caracterizó el enzima final de la síntesis de noradrenalina a partir de la dopamina, la dopamina- β -monooxigenasa (o hidroxilasa) y su presencia en plasma humano, que era muy abundante, como hecho diferencial y pronóstico en la enfermedad de la diabetes y como parámetro sensible en el estrés corporal inducido por el esfuerzo y por el frío, lo que daría lugar a la obtención del título de Docteur

ès Sciences por la Université Louis Pasteur de Strasbourg (Francia) con la calificación de «Tres Honorable» y siendo recibida con las felicitaciones del jurado, Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Paul Mandel, quien descubrió junto con Chambon y Weill, «la síntesis de un ácido poliadenílico aún no caracterizado con la adición de mononucleótido nicotinamida (NMN) en los extractos nucleares de hígado de rata».

En 1975 tomó la decisión de regresar de nuevo a Madrid, retoma su trabajo de investigación, que ya había iniciado en 1970, y realiza su segunda Tesis Doctoral titulada: «Estudio comparativo de la dopamina- β -hidroxilasa bovina y humana. Interés clínico del enzima humano» con la calificación de Sobresaliente Cum Laude, siendo sus directores los Profesores Ángel Santos Ruiz y Paul Mandel. Por ello obtiene el grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Una vez que regresa de Francia en 1975, obtiene un contrato del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el «Instituto Alfonso X el Sabio» (1975-76) y a continuación recibe el primer nombramiento de su carrera docente, Profesor Ayudante de clases prácticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (1976-78).

Es en 1978 cuando por oposición obtuvo el nombramiento de Profesor Adjunto Numerario de Bioquímica con encargo de agregaduría en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, que dirigía el Prof. Alberto Sols. En este Departamento, aparte de realizar su actividad investigadora en la línea de nucleótidos en tejidos neurales y vías de recuperación de las bases libres y de los nucleótidos, tiene que cumplir y desarrollar los programas docentes de pregrado y posgrado que tiene adjudicado el Departamento de Bioquímica.

Es de destacar y ensalzar en la Dra. Miras su movilidad en su carrera académica universitaria. En 1981 obtiene por concurso-oposición la Plaza de Profesor Agregado Numerario de Bioquímica de la Universidad de Oviedo, permaneciendo un año hasta que en 1982 es nombrada Catedrática de Bioquímica de la Universidad de Murcia donde cumple con sus obligaciones docentes e investigadoras, creando un grupo de investigación donde algunos de sus componentes le seguirían en su nuevo destino cuando finalmente en el año 1986 accede a la Catedra del Área de Conocimiento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid, siendo su adscripción la Facultad de Veterinaria. En esta Facultad ocupó desde el año 1987 hasta el 2008, el cargo de Director del Departamento en la Universidad Complutense de Madrid en periodos alternos de cuatro años. En la Facultad de Veterinaria con su incorporación y la creación de los Departamentos establecidos en la Ley Orgánica 11/1983 de Reforma Universitaria se ha desarrollado un importante Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en el que están adscritas diferentes Unidades Docentes y Grupos de Investigación procedentes de la propia Facultad y de la Escuela de Óptica, impartiendo así docencia en diversas Licenciaturas/Grados y Másteres de la Universidad Complutense de Madrid. En su Cátedra de la Universidad Complutense de Madrid ha ejercido un gran magisterio habiendo formado a numerosos discípulos que son a su vez ya

profesores universitarios, directores de grupos docentes o investigadores de la propia universidad y de otras universidades o centros de investigación españoles.

Con el fin de ampliar siempre sus conocimientos científicos, la Profesora Miras Portugal ha realizado diferentes estancias en el extranjero en Instituciones de reconocido prestigio, siempre con el ánimo de ampliar sus campos de investigación y su nivel de actualización permanente; proporciona nuevas ideas, o hipótesis de trabajo para ampliar los mecanismos implicados en el conocimiento de los neurotransmisores del sistema nervioso y en especial el «purinérgico». Tales estancias se hicieron en el National Institutes of Health (NIH) en Bethesda, Maryland, USA (1989) en colaboración con el Profesor H. Pollard estudia el «Transporte de adenosina a células endoteliales»; en el Instituto Gulbenkian de Ciencias en Oeiras, Portugal (1989) en colaboración con el Dr. J. A. Ribeiro con una ayuda de la «International Brain Research Organization» estudia la «Regulación del transporte de adenosina en sinaptosomas»; en el Zoologisches Institut, Johann Wolfgang Goethe de la Universidad de Frankfurt, Alemania (1990) en colaboración con el Profesor H. Zimmermann con una acción integrada hispano-alemana caracteriza «los compuestos dinucleotídicos en terminales sináptico-colinérgicas de torpedo»; en el Physiologisches Institut en la Facultad de Medicina de la Universidad de Dusseldorf, Alemania (1992) con el Profesor J. Schrader, gracias a una acción integrada hispano-alemana caracteriza «la regulación del transporte de adenosina en células de endotelios aórticos»; en el Autonomic Neurosciences Centre del Royal Free and University College Medical School, de Londres, Inglaterra colabora con el Profesor Geoffrey Burnstock en el campo de los «nucleótidos neurotransmisores» con el que forma un grupo de la Unión Europea donde realiza estancias desde el año 1993, y en el Bogomoletzs Institut of Science de Kiev, Ucrania (1993), en colaboración con el Profesor Oleg Krishtal, quien participa en el proyecto INTAS (de la Asociación Internacional para la Promoción de la Cooperación con Científicos de Estados Independientes de la Antigua Unión Soviética). En Estrasburgo en el hoy denominado «Centro de Neuroquímica y Química Biológica» del Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) donde obtuvo el Doctorado en Ciencias ha realizado posteriormente numerosas estancias desde el año 1976 al 1990 primero colaborando con su director de tesis Profesor Paul Mandel y posteriormente con su discípulo el Dr. Dominique Aunis, Directeur de Recherche que dirige el grupo de investigación sobre «Mecanismos moleculares y celulares de la neurotransmisión», y actualmente Director del Instituto Federativo de las Neurociencias de Strasbourg, y del Consejo en Neurociencias del Director General del Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación Médica (INSERM) de Francia.

A lo largo de su carrera científica, la profesora M.^a Teresa Miras Portugal ha publicado 278 trabajos en revistas científicas nacionales e internacionales, de los cuales 200 son internacionales, según los datos bibliométricos obtenidos de la base de datos «Essential Science Indicator» del Web of Knowledge, donde están recogidos los principales parámetros, siendo el

parámetro de calidad científica, índice de Hirsch de 41, excepcionalmente alto para el área de conocimiento de la Neurociencia. En términos de impacto científico sus publicaciones han recibido más de 5.200 citaciones siendo una de las científicas más citadas del área. Sus trabajos de investigación y de revisión son múltiples y valiosos, y se han publicado en revistas de reconocido prestigio internacional, y citaré entre otras FEBS Letters, Journal of Neurochemistry, Biochemical Pharmacology, British Journal of Pharmacology, Neurochemical Research, Diabetes, European Journal of Biochemistry, Journal of Biological Chemistry, Molecular and Cellular Biochemistry, Cancer Research, Neuroscience Letters, Annals of the New York Academy of Sciences, Life Sciences, Analytical Biochemistry, Nature, Cellular and Molecular Neurobiology, Archives of Biochemistry and Biophysics, Biochemistry, Neuroscience, American Journal of Physiology, Molecular Pharmacology, Biochemical Journal, Journal of Physiology (London), Glia, Neuroparmacology, Science, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Trends in Pharmacological Sciences, Brain Research, Purinergic Signalling, Neurotoxicity Research, Journal of Infection Diseases, Neurobiology of Aging, y The Journal of Cell Science.

Ha contribuido con 30 capítulos en libros, monografías y proceedings en el área de Bioquímica y Biología Molecular, Neurociencias y Farmacología Molecular en las que destaco editoriales reputadas como John Wiley and Sons, Taylor and Francis, Plenum Press, y Pergamon Press entre otros y ha presentado numerosas comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.

En su actividad docente es de destacar que la Dra. M.^a Teresa Miras Portugal ha dirigido trece Tesinas de Licenciatura (en Farmacia, Medicina, Ciencias Químicas y Biológicas), nueve Diplomas de Estudios Avanzados y 21 Tesis Doctorales, todas con la máxima calificación de Sobresaliente Cum Laude, ocho de ellas con Premio Extraordinario y diez Doctorados Europeos. Fundamentalmente dirigidas a la neurociencia abordando sus diversos aspectos: Funcionamiento sináptico, neurotransmisión mediada por nucleótidos, e interacción de neurotransmisores entre otros fines. Toda esta actividad docente e investigadora avala la importante y dinámica trayectoria de la Dra. Miras Portugal. Ha sido y es investigador principal de más de 36 proyectos competitivos nacionales e internacionales obtenidos en convocatorias públicas de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, Acciones especiales del II Plan Regional de Investigación de la Comunidad de Madrid, Proyecto de Investigación de Ciencias de la Salud de la Comunidad de Madrid, Consolider del Ministerio de Ciencia y Tecnología, acciones integradas hispano-británica e hispano-alemana, Fundaciones Ramón Areces, La Caixa, y Marcelino Botín, entre otras, e internacionales de la Comisión Europea como BIOMED 2. Todo ello confirma la importante capacidad de captación de recursos que ha tenido a lo largo de los años, de forma interrumpida, para mantener la labor investigadora de su grupo de investigación y

sus numerosas colaboraciones con otros grupos interdisciplinares de investigación nacional e internacional que han trabajado a veces como consorcios, lo que ha dado valor adicional a sus investigaciones.

Ha sido invitada como conferenciante en universidades y centros de investigación europeos y americanos y a seminarios, simposios, y congresos nacionales e internacionales, como son las intervenciones en forma conferencias plenarias a congresos de su especialidad, lo que ha supuesto un marco de proyección de la presentación de sus resultados científicos.

Dotada de gran capacidad de gestión universitaria ha participado activamente en la organización de eventos científicos nacionales tales como Simposio de Neuroquímica en la SEBBM (1988, 1991, 2003); Reunión de la célula cromafín (1990); Transmisión nerviosa purinérgica, Fundación Areces (1993), Simposio de Bioquímica y Biotecnología en el V Congreso de Ciencias Farmacéuticas, Alcalá de Henares (1995); Curso y ciclo de conferencias sobre «Avances en neurociencia: Neurotransmisores y patologías nerviosas», organizado por el Instituto de España (2009) y acontecimientos internacionales tales como: Simposio sobre Purinergic neurotransmission, Congreso de la American Society of Neurochemistry, Houston (Texas, EE.UU.) (1992), 11th Meeting of the European Society for Neurochemistry, Groningen, (Holanda) (1996); Simposio Adenosine Metabolism, Ferrara (Italia) (1998); Simposio Nucleotides as Neurotransmitters, San Petersburg (Rusia) (1998); Workshop on Purinergic Neurotransmission, Joint Meeting International Society of Neurochemistry, ESN, Berlin (Alemania) (1999); 7th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Gold Coast (Australia) (2002); Sesión Crosstalk between cholinergic and other neurotransmitter systems en el XIIth International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Alicante (2005); Simposio New perspectives on basic pharmacology of nucleotides and nucleosides. En la 8th International Meeting on Adenosine and Adenine nucleotides, Ferrara (Italia) (2006); Miembro del Comité Científico Internacional de la International Society for Neurochemistry, ISN, para el XXII Congreso Internacional, Corea (2009); Miembro del Scientific Advisory Board del Symposium Fukuoka Purine (2009), Satellite Meeting del XXXVI International Congress of Physiological Sciences, IUPS, Kyoto (Japón) (2009); Miembro del Comité Científico del XIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Tarragona (2009); Miembro del Comité Científico del Purinergic Meeting International: Purines 2010, Tarragona (2010); y del Simposio sobre P2X7 neuronal versus glial» en el Purinergic Meeting International: Purines 2010, Tarragona; y también Presidenta del Comité Organizador del Congreso Anual de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), Madrid (1997), del International Congress on Purines, Madrid (2000), del Congreso Internacional Purinérgico Ibérico, Madrid (2001), y del II Encuentro de Academias Iberoamericanas de Farmacia, Madrid (2007); así como Chairperson del Scientific Program Committee por el Council de la International Society for Neurochemistry (ISN), Osaka (Japón) (2004), para organizar la parte científica del XXI Congreso internacional conjunto de la International Society for Neurochemistry, ISN,

conjunto con la American Society for Neurochemistry (ASN), Cancún (México) (2007); Organizadora del simposio de la Fundación Areces sobre «Extracellular nucleotides and P2 receptors advances in physiopathology and therapeutics», Madrid (2011).

María Teresa Miras Portugal ha sido Editor Científico de la Revista «Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia» (2003-2011) y del Comité editorial de las revistas internacionales *Journal of Neurochemistry* (1994-2003) y miembro electo del Publications Committee de la Federation of European Biochemistry Societies (2005-2008) y es actualmente Miembro del Editorial Board del *Purinergic Signalling* (desde 2004). Es miembro de diversas Sociedades Científicas Nacionales, tales como la Sociedad de Biofísica de España, la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, y la Sociedad Española de Neurociencias e internacionales como la European Society for Neurochemistry, International Society for Neurochemistry, Molecular and cellular Biology of Chromaffin Cells y miembro fundador del Purinergic Club.

Además ha representado activamente a diferentes Sociedades Científicas Internacionales, siendo Representante electo de la European Society for Neurochemistry en la American Society for Neurochemistry (1992), Miembro del Council de la European Society of Neurochemistry (1993-99), Miembro del Council de la International Society for Neurochemistry (1996-99) siendo además responsable de relaciones internacionales (1996-97) y del Comité de Nominación de esta sociedad (1998-99), Miembro del Advisory Board de la Molecular and Cellular Biology of Chromaffin Cells (1991-95), y Miembro del Advisory Board de Purinergic Club (desde 1990). Así mismo ha sido Secretaria electa de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (1998-2001).

De entre los múltiples nombramientos señalaré que ha sido Presidente de la Ponencia IV de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (1996-1997), Miembro del Gabinete de Biotecnología (GABIOTEC), promovido por la Fundación Centro de estudios para el fomento de la investigación (CEFI) (desde 1996), Miembro del Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) para los receptores de la familia P2Y (2000), Miembro del jurado de la Unión Europea para la concesión del Premio para Jóvenes Científicos (EU Contest for Young Scientists) (2000 y 2002), Evaluador de la Comisión Europea en el Área de Neurociencias en varias convocatorias (desde 2000), Miembro del Jurado del Premio Francisco Cobos (2002-2008), Miembro del Comité Científico de la North Atlantic Treaty Organization (NATO/OTAN) (2001-2004), Miembro del Comité Científico Asesor del Club de Roma (desde 2003), Miembro de la Fundación Española de Ciencia y Tecnología (FECYT) (2003-2006), Miembro electo de la Junta Consultiva del Rector de la Universidad Complutense de Madrid (2004-2006), Miembro electo del Comité de publicaciones de FEBS (desde 2005), Miembro de las «Comisiones de Reflexión y Estudio de la Ciencia en España» (Acción CRECE), Miembro de la Ponencia: «España en Europa» (2004-2005) promovido por la Confederación de sociedades Científicas de España, Miembro del Jurado del

Premio Príncipe de Asturias (2005-2007), Miembro del Jurado del Premio Jaime I de Ciencias Básicas (2006-2007), y Nombrada «Patrono de la Fundación Juana de Vega» (2008-).

La Profesora Miras Portugal es Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia (2001), previamente Académica Correspondiente (1996), miembro de la Junta Rectora del Instituto de España (desde 2010), Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia (desde 2006), Académica Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Catalunya (2009), Miembro de la Academia de Ciencias de la URSS, Sección Armenia (2008), Académica de Honor de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina (2009), Académica —Miembro titular— de la European Academy of Sciences, Arts and Literature (2010), de la European Academy (2011) y Académico electo de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, donde tomara posesión en 2012.

Está en posesión de numerosas distinciones y premios. Es «Lazo de Alfonso X El Sabio» en el año 1971, concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia, «Víctor de Plata» en el año 1971, «Premio Crei de Oro» en el año 1983, por el uso de la informática aplicada a la enseñanza de la Bioquímica, «Premio de la Confederación Española de Organizaciones Empresariales (CEOE)» de Ciencias Biomédicas-2004, «Premio AMAVI» 2006, por la relevante actividad científica, nombramiento de «Galega Destacada de 2007» y entregado en el Pazo Quiñones de León el 9 de febrero de 2008, «Premio de investigación de la Xunta de Galicia» 2008, «Premio María Josefa Wonenburger» en su 2.^a edición, «Nombramiento de Farmacéutica Ejemplar» de la asociación de antiguos alumnos de Facultades de Farmacia (2010) y el año pasado la Comunidad de Madrid le ha concedido el Premio de Investigación «Miguel Catalán», premiando así a la labor de la investigadora Dra. Miras Portugal, que goza de prestigio y reconocimiento internacional.

EL DISCURSO DE ENTRADA

Después de escuchar la magistral y bien pergeñada disertación de ingreso en esta Real Academia de la Dra. M.^a Teresa Miras Portugal sobre la «Importancia de los modelos animales en el estudio del sistema purinérgico» y teniendo en cuenta su estructura, presentación y revisión de los aspectos e hitos científicos más relevantes del sistema nervioso purinérgico, bajo el punto de vista conceptual es un discurso con rigor científico y su revisión histórica es especialmente de interés no solo por su contenido sino por las hipótesis de trabajo que vierte a lo largo de las etapas de investigación que ha seguido la autora con el único objetivo de ir profundizando en el conocimiento de las bases bioquímicas de la neurotransmisión purinérgica.

Inicia su exposición abordando dos hechos de gran relieve para un científico: el primero, en el conocimiento que ha existido a lo largo de los años sobre el aislamiento, purificación y caracterización de sustancias ac-

tivas naturales con valor terapéutico a partir de plantas, como pudo ser la morfina y el ácido salicílico, así como sobre la síntesis de compuestos a través de la química orgánica que se efectuó durante los siglos XIX y primeros años del siglo XX, como fue el caso del ácido barbitúrico y sus derivados, para los que antes de ser empleados en terapéutica a veces se usaron en modelos animales para observar su efecto farmacológico o toxicológico. Como ha indicado muy bien la Dra. Miras Portugal, es de suponer que hubo muchos fracasos terapéuticos e intoxicaciones de las que no tenemos información, ya que pudo ser celosamente ocultada; esta posibilidad y el número elevado de compuestos farmacológicos que deben ensayarse, junto con los aspectos económicos que conlleva descubrir nuevas sustancias medicamentosas, pusieron de manifiesto la necesidad de canalizar y racionalizar estos experimentos buscando modelos animales adecuados de estudio. Y el segundo, la necesidad y búsqueda de modelos animales de experimentación para llevar a cabo los procedimientos de investigación. Como señala Claude Bernard, fisiólogo y padre de la medicina experimental moderna: «la experimentación se hace imprescindible y es necesario enfrentarse con la mente totalmente abierta, sin estar sometido de forma incondicional a teorías previstas», aunque el mismo vivió un drama familiar debido a la escasa acogida de la investigación animal y el rechazo social de tal práctica. En los últimos años la experimentación con animales ha sido acogida como necesaria, aunque actualmente existen muchos detractores y movimientos en contra, por el posible sufrimiento a que se someten los animales, y por ello se está ante la búsqueda de modelos alternativos en experimentación animal. Sin embargo, es de relieve indicar que para la seguridad de los medicamentos son imprescindibles los estudios pre-clínicos toxicológicos con roedores y no roedores. Es de destacar también a este último respecto que existen directrices sobre la viabilidad de reemplazar estudios animales no clínicos por investigaciones *in vitro* siempre que estos métodos alternativos estén validados para la presentación de nuevos medicamentos de uso humano. La nueva Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, señala que la utilización de animales vivos sigue siendo necesaria para proteger la salud humana y animal y el medio ambiente. No obstante, la presente Directiva constituye un importante paso hacia el objetivo final de pleno reemplazo de los procedimientos con animales vivos para fines científicos y educativos, tan pronto como sea científicamente posible hacerlo. En la elección de los métodos deben aplicarse los principios de las tres R «reemplazo, reducción y refinamiento» mediante el respeto de la estricta jerarquía del requisito de utilizar métodos alternativos. Cuando no haya un método alternativo reconocido por la legislación de la UE, puede reducirse el número de animales utilizados recurriendo a otros métodos y aplicando estrategias de experimentación tales como el uso de métodos *in vitro* u otros métodos que puedan reducir y perfeccionar la utilización de animales. La elección de los métodos y de las especies que van a utilizarse tiene un impacto directo tanto sobre el número de animales utilizados como sobre

su bienestar; debe seleccionarse, por tanto, el método que pueda proporcionar los resultados más satisfactorios y provocar el mínimo de dolor, sufrimiento y angustia. El tejido y los órganos de los animales se utilizan para el desarrollo de métodos *in vitro*. La existencia de métodos alternativos depende en muy gran medida de los progresos realizados en la investigación dirigida a su desarrollo.

En el discurso de la Dra. Miras Portugal se evidencia que tanto ella como los miembros de su equipo han utilizado varios modelos de animales normales y de animales en donde existe la modificación de su dotación genética (*knock-in*, *knock-out*), así como tejidos y fibras procedentes de estos animales, siempre respetando las buenas prácticas y la ética en experimentación según procedimientos autorizados, así como técnicas de biología y genética molecular y receptores, análisis físico-químico, bioestadística, entre otros, necesarios para con la reproducibilidad de los resultados dar nuevas evidencias científicas en el campo del sistema nervioso purinérgico. A lo largo del discurso describe las especies y estirpes de animales y las partes de los mismos estudiadas (órganos, tejidos, células) y empleadas en la investigación de la fisiología y bioquímica del sistema nervioso purinérgico.

A continuación hace una breve historia de los primeros compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos. Entra en el terreno de la señalización purinérgica y establece que después del ácido úrico se aisló el segundo compuesto purinérgico, la guanina. Hace una mención especial al modelo de los perros dálmata y a los cien años de estudio para comprender la excreción del ácido úrico. El perro dálmata, a diferencia de los otros perros, no es capaz de metabolizar el ácido úrico, siendo semejante a los humanos, lo que da importancia a la buena elección de una especie y raza animal, o bien de una determinada fibra neuromuscular de una especie o raza animal en la diferenciación de receptores. Todo ello debe tenerse en cuenta cuando se plantea un trabajo experimental referido con lo que aun no es conocido, e implica que los resultados de tal trabajo no pueden ser especificados de antemano.

A este respecto quisiera destacar la importancia de la medicina traslacional que es la rama de investigación médica que intenta conectar más directamente los conocimientos de la investigación básica (biología molecular, genética) con el cuidado de los pacientes o la transformación de lo que se obtiene en el laboratorio en nuevas maneras de diagnosticar y tratar a los enfermos. A menudo se describe como un esfuerzo para llevar los conocimientos científicos del laboratorio a la cabecera del enfermo (llamado *bench to bedside*). Se definiría también como la conjunción de las investigaciones básicas orientadas al paciente, junto con las investigaciones preclínicas y las clínicas. Para realizar investigación traslacional, numerosos hospitales de referencia en el mundo cuentan con unidades de investigación traslacional, las cuales han generado o se encuentran integradas a líneas de investigación básicas o preclínicas de los centros de investigación biomédicos o de las industrias farmacéuticas biotecnológicas, para lo cual se necesitan grupos interdisciplinarios. Destaco este punto porque la investigación preclínica debe de hacerse siempre con una orientación basada en

la necesidad y búsqueda de una buena elección de los modelos y técnicas experimentales, tal como se ha señalado en este discurso.

En la línea de la historia de los compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos señalaremos que el primer nucleótido descrito fue la adenosina monofosfato (AMP) aislado a partir del músculo esquelético por Embden y Zimmermann en 1927. Dos años más tarde la molécula de adenosina 5' trifosfato o ATP fue descubierta en 1929 en dos laboratorios diferentes, Heidelberg y Boston por Lohman y Fiske y Subbarow, respectivamente. Muy pronto después se evidenció el papel central del ATP como fuente del metabolismo energético celular y principalmente su función intracelular. El ATP es esencial en muy diversos procesos dentro de la célula, entre otros los que tenemos: la regulación de las funciones proteínicas como sustrato de proteína-quinasa, como ligando alostérico, para el mantenimiento de los gradientes iónicos de membranas, la biosíntesis de macromoléculas, y como precursor de los eslabones de RNA y del DNA. Muy pronto después se evidenció el papel central del ATP en la materia viva que es único; sin ATP nosotros, con toda probabilidad, no seríamos testigos de nuestra vida en las formas actuales. De hecho las formas de vida que nosotros conocemos en la tierra se construyen alrededor del código genético que es almacenado en moléculas relativamente simples de ADN y ARN compuestas de purina adenina y de pirimidinas, guanina, uracilo y timina. Las purinas y pirimidinas, así como también el ATP y GTP, la mayoría aparecen en el periodo prebiótico, con derivados adenina, siendo sintetizados preferentemente como resultado de las reacciones térmicas. Muy pronto en la evolución, el ATP se elige como un sustrato energético, para formar el metabolismo de todas las formas de vida. La preponderancia del ATP estimuló la evolución de los enzimas con propiedades de unión preferenciales y los nucleótidos adenina empezaron a ser usados en varias cascadas señalizantes intracelulares, tales como, por ejemplo, la cascada AMPc. Al mismo tiempo, el ATP se convierte en la primera molécula señalizante extracelular, debido a su total disponibilidad.

A continuación la Dra. Miras Portugal nos habla de los primeros pasos en el estudio de los efectos extracelulares de los compuestos purinérgicos abarcando la importancia del modelo de administración de cafeína para discernir las acciones de la adenosina. En esto último comenta que en la década de 1960 comienza a utilizarse la fibra lisa neuromuscular longitudinal denominada *taenia coli* aislada a partir del intestino grueso de cobaya. Esta fibra lisa en baños de órganos se utiliza para estudiar el efecto contráctil de muchas sustancias activas; así se demostró que el ATP aplicado en la solución en el baño de órganos suprimía la respuesta espontánea de la *taenia coli* a la actividad eléctrica, produciendo la hiperpolarización de la membrana muscular. Se identificó por Axelsson que el ATP es el nucleótido que tiene mayor actividad y que por el contrario el AMP y la adenosina tenían una actividad casi inexistente. Sin embargo, la adenosina era el auténtico compuesto fisiológicamente activo que mediaba en la vasodilatación coronaria como respuesta a la hipoxia. Como hipótesis de partida se basaba en el hecho de que los niveles miocárdicos de ATP en el miocardio descendían en

la hipoxia y que la pérdida de la carga energética conducía a una mayor formación y liberación de adenosina. No obstante, la hipótesis resultó solo cierta en parte, ya que incluso en hipoxia, el corazón liberaba ATP, y su acción puede inducir a las células del endotelio vascular a producir óxido nítrico, responsable de la vasodilatación. El uso de los antagonistas metilxantinas, y en concreto la cafeína inhibía la acción de la adenosina, y fue durante mucho tiempo el único fármaco que permitió establecer diferencias fiables entre receptores de adenosina y los de nucleótidos.

El interés científico por el sistema de señalización purinérgico que incluye purinas y pirimidinas como transmisores químicos y purinoceptores como efectores está siendo investigado en profundidad en cuanto su evolución y desarrollo, siendo un factor esencial en la comunicación celular. El descubrimiento de la neurotransmisión no-adrenérgica no-colinérgica (NANC) (hoy purinérgica) en el intestino y la vejiga de la orina de cobayo a principios de los años sesenta, es descrito como la identificación de la adenosina 5'-trifosfato (ATP) como un transmisor en las terminaciones nerviosas posteriormente en los años setenta. El concepto de co-transmisión purinérgica ya fue formulada en 1976 y se reconoce ahora que el ATP era un co-transmisor en el sistema nervioso periférico y central. Dos familias de receptores a purinas fueron reconocidos en 1978, receptores P1 (adenosina) y receptores P2 sensibles al ATP y adenosina difosfato (ADP).

La clonación de estos receptores al comienzo del año 1990 dio lugar a la aceptación de la hipótesis señalizante purinérgica, existiendo actualmente cuatro subtipos de receptores P1, siete subtipos de subunidades de receptores inotrópicos y ocho subtipos de receptores acoplados a la proteína G. Ambos señalizantes purinérgicos a corto plazo en la neurotransmisión, neuromodulación y neurosecreción y señalizantes purinérgicos a largo plazo (tróficos) de proliferación celular, diferenciación, motilidad, muerte en el desarrollo y regeneración. Sin embargo no existe mucho conocimiento sobre los mecanismos que fundamentan la liberación de ATP y la ruptura extracelular por ecto-nucleasas. Recientemente se hace hincapié en la neuropatología purinérgica incluyendo cambios en la co-transmisión purinérgica en el desarrollo y envejecimiento en enfermedades de la vejiga urinaria y en la hipertensión. Se consideran también la implicación de la interacción célula glial-neurona en varias enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo el dolor neuropático, trauma e isquemia, enfermedades neurodegenerativas, desordenes neuropsiquiátricos y epilepsia.

Haciendo un pequeño inciso me gustaría hacer una breve historia del profesor Burnstock, pionero de los estudios purinérgicos. El mismo relata que la historia del sistema nervioso purinérgico comienza cuando el aceptó su primer puesto posdoctoral en el Departamento de Fisiología del National Institute for Medical Research, Mill Hill dirigido por el Dr. W. Feldberg. De allí paso a tener otra posición posdoctoral en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Oxford (Inglaterra) dirigido por el Dr. Edith Bülbbring, quien lidero un laboratorio muy importante sobre fibra lisa. Allí Burnstock estudio las acciones de los clásicos neurotransmisores, acetilcolina y noradrenalina usando la técnica de «sacarosa-gap» y un día

decidió estimular las terminaciones nerviosas que inervan la fibra lisa muscular *taenia coli* de cobayo en presencia de atropina y bretilium para bloquear la neurotransmisión colinérgica y adrenérgica y observó una despolarización y contracción como respuesta a la estimulación directa de esta fibra lisa. Sin embargo, su sorpresa fue que las respuestas al estímulo eléctrico originaban hiperpolarización rápida y relajación. A continuación observó como la tetrodotoxina, toxina obtenida del pez globo y bloqueante de los canales de sodio, bloqueaba la conducción nerviosa sin afectar la actividad de la fibra muscular. La tetrodotoxina abolía las hiperpolarizaciones, y se dio cuenta que eran potenciales de unión inhibitorios en respuesta a la neurotransmisión NANC. Después de realizar una estancia en el laboratorio de Mike Rand en la Universidad de Londres pudo observar que estas respuestas inhibitorias NANC, se encontraban en neuronas entéricas intrínsecas controladas por nervios parasimpáticos vagales o sacrales, como las fibras neuromusculares anocoxigeus y retractor penis.

Un paso posterior fue identificar el transmisor liberado durante la transmisión inhibitoria en el intestino y por la transmisión excitatoria NANC que luego se identificó en la vejiga de la orina. Por los trabajos de Jack Eccles y otros, sabemos que se necesitan varios criterios para cumplir con el establecimiento de un nuevo neurotransmisor: síntesis y almacenamiento en las terminaciones nerviosas, liberación por mecanismos Ca^{2+} -dependiente; mimetice las respuestas nerviosas mediadas por el transmisor aplicado exógenamente, inactivado por ectoenzimas y/o captación neuronal, y bloqueo paralelo o potenciación de respuestas a la estimulación nerviosa y por la aplicación del transmisor exógeno.

Ya Drury y Szent-Györgyi (1929) demostraron las acciones extracelulares de las purinas sobre el corazón y los vasos sanguíneos, y los trabajos de Feldberg y Hebb (1948) demostrando las acciones extracelulares de la adenosina 5'-trifosfato (ATP) en los ganglios cervicales superiores de gato y un trabajo de Pamela Holton (1959), que demostró la liberación de ATP durante la estimulación antidrómica de los nervios sensoriales que inervan la arteria de la oreja del conejo.

Así y colaboradores (1970) ensayaron el ATP y cumplió con todos los criterios que se necesitaban para establecer a este como un transmisor implicado en la neurotransmisión NANC.

En 1971 se descubrió por Su y colaboradores un hecho desconcertante que fue la liberación de ATP a partir de las neuronas entéricas inhibitorias intrínsecas, pero también a partir de los nervios simpáticos que inervan la *taenia coli*. Por ello se pensó que el ATP podría liberarse como un co-transmisor a partir de los nervios simpáticos, aunque esto creó controversia debido al amplio concepto postulado por Sir Henry Dale y denominado «Principio de Dale», aunque actualmente definido por Eccles, de que un nervio solo libera un neurotransmisor.

En 1972, Burnstock publicó, en la revista *Pharmacological Reviews*, la hipótesis de la neurotransmisión purinérgica. Tristemente, pocos creyeron en esta hipótesis y durante años fue a menudo cuestionado en meetings y workshops. Yo he tenido la ocasión de observar en los meetings de la

Physiological Society (London) que los proceedings procedentes de estas reuniones solo se publican previa autorización de los presentes en la sala de exposición que solían ser científicos de muy primera línea. Es curioso que cuando obtuviera la Cátedra de Anatomía y Embriología de la University College London in 1975, el Professor Austin Doyle, le dijo en su recepción de bienvenida «Geoffrey Burnstock es el descubridor de la hipótesis pura-imaginativa».

Se podía comprender la resistencia a este concepto quizás comprensible debido a que el ATP fue establecido bien como una fuente de energía intracelular implicada en el ciclo de Krebs y otras vías bioquímicas y parecería improbable que tal molécula ubicua pudiera actuar como un mensajero extracelular. Pero posteriormente se reconoció al ATP, como una molécula biológica, que desarrolla una fuente de energía intracelular y es una molécula señalizante extracelular.

En el 2007, Burnstock señaló que la co-transmisión purinérgica está hoy bien establecida no solo en los nervios simpáticos sino en los parasimpaticomiméticos, sensoriales-motores y nervios entéricos y más recientemente se sabe que el ATP se ha demostrado estar co-liberado con glutamato, GABA, dopamina, NA, 5-HT y ACh en diferentes tipos de terminaciones nerviosas en el SNC. En 1990, conocidos trabajos describieron la mediación del ATP en la transmisión sináptica rápida en ganglios periféricos y en el SNC.

La Dra. Miras analiza, muy sugestivamente, el descubrimiento de los compuestos dinucleotídicos conocidos como di-adenosina polifosfatos (AP4A, Ap5A, Ap6A) en las vesículas de secreción neurales, tanto de naturaleza aminérgica como colinérgica. El material biológico usado eran los gránulos cromafines aislados de la médula de las glándulas suprarrenales de bóvidos. Estos nuevos compuestos han demostrado ser neurotransmisores de pleno derecho y son liberados mediante exocitosis calcio-dependiente. El almacenamiento vesicular de nucleótidos y dinucleótidos, utiliza un mismo transportador y está ampliamente distribuido en el sistema nervioso y los tejidos neuroendocrinos. Son poco específicos y difícilmente saturables, comportándose con cinética mnemónica.

La presencia de los compuestos nucleotídicos y dinucleotídicos en el efluente o perfundido cerebral de ratas *in vivo* canuladas en el sistema ventricular mediante la técnica de «push pull» (infusión-succión) en las que se miden estos compuestos en fluido cerebroespinal, ha añadido valor a las acciones neurotransmisoras de estos compuestos, cuya concentración se incrementa cuando el cerebro es sometido a una estimulación intensa. La semivida más larga de los dinucleótidos en los ventrículos cerebrales pone de manifiesto su posible papel como factores tróficos neurales.

La Dra. Miras Portugal destaca el conocimiento desde el punto de vista cinético del comportamiento de los transportadores de nucleótidos al interior de los orgánulos de secreción (es decir, los transportadores vesiculares de nucleótidos), la caracterización de los transportadores neurales de adenosina, las estrictas regulaciones que sufren, tanto a corto (mediante fosforilación) como largo plazo (expresión mediada por hormonas tiroideas), y

por primera vez la descripción de un nuevo modo de regulación, el control mnemónico de la cinética de transporte. Este tipo de regulación por transición lenta de la estructura proteica activa en la membrana, es actualmente un concepto necesario para entender las transiciones en receptores y enzima, así como otras proteínas activas en la membrana. La técnica para estudiar la cinética de comportamiento de los transportadores de nucleótidos se basa en la utilización de análogos fluorescentes del ATP, el eteno-ATP (1,N6-etenoadenosina trifosfato). El análisis de los nucleótidos transportados al interior granular se efectuó mediante técnicas de HPLC y detección mediante fluorescencia de los nucleótidos en el eluido cromatográfico. El estudio del transporte de nucleótidos mediante citometría de flujo es otra técnica utilizada.

El almacenamiento vesicular y la presencia del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) en tejidos neurales y secretores originan como resultado la salida exocitótica de ATP que a su vez tiene un efecto extracelular. Es conocido como la liberación vesicular, requiere de una señal desencadenante, una despolarización celular, y la entrada de calcio al citosol. Entre los datos obtenidos por el equipo de la Dra. Miras Portugal se observó que en una línea celular, la de neuroblastoma N2a, el ATP a través de sus receptores P2X (ionotrópicos) induce la exocitosis de los propios nucleótidos almacenados en vesículas. El ATP es capaz de activar el receptor P2X7 presente en la membrana plasmática de la neurona. El receptor P2X7 es un canal operado por ligando que en presencia del agonista abre la compuerta para el ion Ca^{2+} . La exocitosis vesicular es mediada por el ion calcio que, a su vez, permite la fusión de las organelas y produce un incremento de la superficie de membrana aumentada al estimular con el agonista P2X7. El ATP liberado produce además una onda de ATP que induce la señalización en otras neuronas y el estímulo puede ser bloqueado con el BBG, antagonista del P2X7. Los inhibidores de la salida exocitótica tales como la N-etilmaleinimida y la toxina botulínica bloqueaban este proceso. Por lo tanto la salida exocitótica controlada en tejidos neurales y secretores se creyó es la más importante y que en las hendiduras sinápticas es la única o la mayoritaria.

Otro aspecto de interés en este discurso de ingreso ha sido la descripción de la clasificación actual de los receptores purinérgicos. Como hemos señalado previamente por el Profesor Geoffrey Burnstock que el 1978 propuso la subdivisión de los receptores purinérgicos en P1 [respondían a adenosina y eran antagonizados por metilxantinas (caféina y teofilina), recibiendo posteriormente el nombre de receptores tipo A, ya que entre todas las bases púricas y pirimidínicas y sus respectivos nucleósidos ninguno de ellos presentaba efectos agonistas significativos, y los receptores purinérgicos P2 (que respondían a nucleótidos). Como paso para otros neurotransmisores los efectos sobre cascadas de señalización tuvo que ser gracias a los modelos animales y los tejidos/células disponibles. Los adipocitos fueron esenciales para el estudio del receptor adenosina y el descubrimiento de que la caféina era un antagonista de estos receptores fue debido a la activación de la triglicérido lipasa, que como resultado originaba una lipólisis. Hoy a la caféina

se le atribuyen otro tipo de efectos beneficiosos, como pueden ser que frena la enfermedad de Alzheimer y otras demencias donde la implicación de los receptores de adenosina A2A es objetivo principal para la neuroprotección ofrecida por el consumo de cafeína.

Es de destacar que el equipo de la Profesora Miras Portugal ha demostrado como la activación de los receptores presinápticos de adenosina (P1) modula la respuesta a nucleótidos y dinucleótidos en terminaciones nerviosas de cerebro de rata, actuando sobre los receptores P2X1 y P2X3. Esto soporta el hecho de la importancia de la adenosina en las funciones cerebrales sin menospreciar aquellas que se producen en los sistemas cardiocirculatorio, inflamatorio o inmune, pero se necesita el desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas selectivos que sean eficaces y seguros como muy bien ha señalado la Dra. Miras Portugal.

En otro orden de hechos, ha presentado la importancia del ATP como neurotransmisor y activador de los receptores de nucleótidos P2 que se dividen en dos familias P2X y P2Y según Burnstock y Kenedy (1985). La respuesta a la activación de los receptores P2X (ionotrópicos operados por ligandos) se traduce en una vasoconstricción y contracción del músculo liso visceral y la del receptor P2Y (metabotrópicos acoplados a proteínas G) en una vasodilatación y relajación de la fibra lisa del estómago. Hasta la actualidad se han clonado y caracterizado siete subunidades de los receptores P2X y ocho subtipos de los receptores P2Y en tejidos humanos y de animales. El receptor P2Y12 está presente en las plaquetas y presenta afinidad específica al clopidogrel (Plavix) y otros análogos como antiagregantes plaquetarios, lo que ha supuesto un antes y un después en el tratamiento del ictus cerebral y el infarto de miocardio al evitar la formación de trombos. En los modelos neurales estudiados por el grupo de la Dra. Miras, uno de los receptores más relevantes es el receptor P2Y13, que es esencial en la supervivencia neuronal, actuando sobre la glucógeno sintasa quinasa 3, enzima implicado en procesos de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

Los receptores ionotrópicos de nucleótidos y dinucleótidos, familia P2X también han sido brillantemente abordados en esta disertación. El descubrimiento de la existencia de receptores ionotrópicos para nucleótidos y dinucleótidos en terminaciones presinápticas ha dado un vuelco al concepto de que la información sináptica viaja exclusivamente de la pre- a la post-sinapsis. En este momento se puede decir, sin duda, que la propia señal que despolariza la zona presináptica e induce exocitosis, libera compuestos que refuerzan y modulan la zona presináptica. Estudios en terminaciones nerviosas aisladas, mediante microfluorimetría han permitido identificar la localización de los receptores y sus respuestas. Recientemente, el grupo de la Dra. Miras Portugal ha descrito la presencia de receptores ionotrópicos de nucleótidos en astrocitos lo que ha ampliado la señal hasta estructurar la sinapsis tripartita.

Los receptores P2X1-P2X7 son muy abundantes en las terminaciones colinérgicas, sobre todo los P2X3 y P2X7 que co-localizan y se intermodulan con los receptores ionotrópicos nicotínicos sensibles a epibatidina,

alcaloide natural de tipo piridínico con actividad analgésica. Aspecto relevante ya que en la enfermedad de Alzheimer son los núcleos colinérgicos los que primero se ven afectados en el cerebro humano y es notorio el déficit colinérgico, lo que debe paliarse en su tratamiento.

Los receptores de nucleótidos P2X y P2Y son potenciales dianas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cuyo potencial y dimensión necesita ser estudiado en profundidad y evaluado. Los modelos de murinos para estas enfermedades han sido de mucho valor según ha sido presentado. Destaca la importancia, tanto en la enfermedad de Huntington como en Alzheimer, del receptor P2X7, el cual es una excelente diana terapéutica y su antagonista el colorante alimentario E 133, azul brillante BBG, aditivo capaz de teñir los alimentos de color azul, actúa impidiendo la destrucción de las terminaciones sinápticas, sobre todo de naturaleza glutamatérgica, sobreexcitadas por la activación de estos receptores. La recuperación del control del movimiento y la reducción de la pérdida de peso en los ratones Huntingtonianos tratados con BBG, han aportado un rayo de esperanza para diseñar nuevos tratamientos contra esta enfermedad devastadora. De nuevo el receptor P2X7 juega un papel esencial durante el desarrollo del cerebro, ya que está presente en el cono de crecimiento axonal controlando la longitud del axón y por lo tanto hasta donde puede llegar para establecer la conexión precisa. La utilidad de este descubrimiento en el establecimiento de nuevas conexiones y reparaciones en el cerebro adulto son otro de los pilares que sostienen el valor de los hallazgos del grupo dirigido por la Profesora Miras Portugal.

Para finalizar señalaré como se deduce del discurso del beneficiario que hay que abordar la neuropatología purinérgica comparada y su potencial terapéutico. Observamos que los modelos animales no nos dan los mismos resultados que los que se podrían obtener en humano. Así se ha establecido que el ATP fue un co-transmisor principal con la acetilcolina en los nervios parasimpáticos que median la contracción de la vejiga urinaria de roedores. En vejiga procedente de humanos sanos sin embargo el papel del ATP como neurotransmisor es menor, sin embargo en condiciones patológicas tales como la cistitis intersticial, la obstrucción del flujo hacia el exterior y la mayoría de tipos de vejiga neurógena, el componente purinérgico se aumenta en alrededor el 40%. Similarmente, en ratas hipertensivas espontáneas, existe un papel significativamente mayor para el ATP en los nervios simpáticos. Otra hipótesis aceptada que describe es que la transducción mecano-sensorial purinérgica en órganos viscerales, donde el ATP es liberado a partir de las células epiteliales de la cubierta durante la distensión, actúa sobre los receptores P2X3 and P2X2/3 en las terminaciones nerviosas sensoriales sub-epiteliales enviando mensajeros nociceptivos vía ganglios sensoriales a los centros del dolor en el cerebro. En el dolor neuropático e inflamatorio han sido implicados los receptores P2X4, P2X7 y P2Y12 de la microglia y los antagonistas para estos receptores han sido muy efectivos para abolir la alodinia.

Existe actualmente mucho interés en la interacción entre células neurales y gliales en el SNC y en la potencialidad de la señalización purinérgica

para paliar las situaciones de trauma e isquemia, o las condiciones neurodegenerativas, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y en la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica. Por último hay nuevos datos y cierto progreso en la comprensión y estudio de la señalización purinérgica en enfermedades neuropsiquiátricas incluyendo la depresión, ansiedad y esquizofrenia y en ataques epilépticos.

Antes de finalizar quisiera que al éxito de la Profesora Miras Portugal ha contribuido sustancialmente su esposo Fernando Varela, también Catedrático de Universidad en la especialidad de Geometría y Topología Diferencial de la Universidad Autónoma de Madrid, que ha sabido compartir peregrinaje universitario, y a su vez comprenderla y seguirla en sus éxitos profesionales. Tampoco quiero olvidar a sus hijos Fernando y Alberto, que forman parte consustancial de su vida.

El buen conocimiento y hacer de María Teresa Miras Portugal se hace patente en el excelente discurso de ingreso que acabamos de escuchar en esta Real Academia de Ciencias Veterinarias. Por todo ello, querida amiga María Teresa, en nombre de esta Real Corporación y de todos sus Académicos me complace darte la bienvenida y decirte que nos alegramos de tenerte como Académica de Número con el ánimo de que nos engrandezcas en respuesta a nuestras necesidades en su proyección. Estamos seguros que tus aportaciones futuras desde una disposición siempre dialogante y abierta a escuchar nos ayudaras a acrecentar el prestigio y dinamismo en la misma a través de las ciencias básicas y que forman un patrimonio común puesto al servicio de las ciencias veterinarias que tanta incidencia social tienen. Por ello, Yo en nombre de todos los miembros de esta Real Academia de Ciencias Veterinarias recibe mi más afectuosa bienvenida a esta tu casa con el deseo de recibir tus enseñanzas junto a la solidaridad y espíritu colaborador y que tu andadura sea firme, segura y fecunda.

He dicho.

