

**REAL ACADEMIA DE DOCTORES  
DE ESPAÑA**

**LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS:  
PIEZAS CLAVE EN LA FORMACIÓN  
DEL SISTEMA NERVIOSO**

**DISCURSO  
PRONUNCIADO POR LA**

**EXCMA. SRA. DOÑA MARIA TERESA MIRAS PORTUGAL**

**EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN  
COMO ACADÉMICA DE NÚMERO  
EL DIA 6 DE MARZO DE 2019**

**Y CONTESTACIÓN DE LA ACADÉMICA DE NÚMERO**

**EXCMA. SRA. DOÑA ROSA BASANTE POL**



**MADRID  
MMXIX**

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

Editor: María Teresa Miras Portugal  
Real Academia de Doctores de España  
San Bernardo, 49. 28015 Madrid, España (Spain).

Tel: 91 531 95 22 Fax: 91 524 00 27  
Correo: rad@radoctores.es

ISBN: 978-84-949499-5-1  
D.L.: M-5774-2019

Madrid, 6 de marzo de 2019.  
©Real Academia de Doctores de España. Todos los derechos reservados.  
Prohibida su reproducción total o parcial.

# ÍNDICE

DISCURSO DE INGRESO DE LA EXCMA. SRA. DRA. DOÑA MARIA TERESA MIRAS-PORTUGAL .....	5
AGRADECIMIENTOS Y JUSTIFICACIÓN .....	5
LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS: PIEZAS CLAVE EN LA FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS Y SU ORIGEN EVOLUTIVO .....	11
2.1. El nucleósido Adenosina y sus receptores .....	11
2.2. Los receptores de nucleótidos, naturaleza, familias y función .....	12
2.2-a Los receptores P2Y .....	12
2.2-b Los receptores P2X .....	14
2.2-c El receptor P2X6. Mi homenaje a Don Santiago Ramón y Cajal .....	15
2.2-d ¿Existe alguna relación entre el receptor P2X6 y los corpúsculos nucleares, denominados cuerpos de Cajal (Cajal Bodies)? .....	15
2.2-e El receptor P2X7 .....	17
2.2-f Origen de los receptores P2X y P2Y .....	19
3. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR: ¿EN QUE CONSISTE LA CO-TRANSMISIÓN? .....	21
3.1. El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) .....	22
3.2. Vías purinérgicas y aminérgicas cerebrales. Co-transmisión .....	23
3.2-a Los transportadores vesiculares de catecolaminas y serotonina. ....	23
3.2-b El transportador vesicular de acetilcolina. ....	25
3.3. La liberación conjunta del ATP y otros neurotransmisores co-almacenados .....	26
3.3-a El modelo de estudio de la sinapsis colinérgica/ATP del órgano eléctrico del Torpedo .....	26
3.3-b Co-transmisión en el Sistema Nervioso Autónomo: el modelo de la sinapsis simpática del vaso deferente de mamíferos. ....	27
3.4. Receptores purinérgicos presinápticos en el Sistema Nervioso Central y Co-transmisión .....	27
3.4-a Presencia de receptores P2X en la zona presináptica de terminales colinérgicas y aminérgicas .....	28
3.4-b Sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas estimulación por receptores P2X. Neuronas granulares: ¿Se almacenan conjuntamente el ATP y el glutamato? .....	29

4. FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X7 Y OTROS ACTORES EN LA ELONGACIÓN AXONAL EN EL DESARROLLO Y LESIONES .....	31
4.1. El cono de crecimiento: Mecanismos del P2X7, y de los receptores P2Y1 y P2Y13. ....	32
4.2. P2X7 en la epilepsia por lesión del lóbulo temporal. El modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP, .....	34
4.3. ¿Cómo consigue una neurona eliminar el ATP extracelular para evita que los receptores P2X7 se activen?: Ecto-nucleotidasas, la TNAP .....	37
4.3-a ¿Es la TNAP un nexo de unión de la señalización purinérgica con la colinérgica en la enfermedad de Alzheimer? .....	38
4.4. Receptores de nucleótidos implicados en las lesiones de médula espinal .....	39
4.5 El modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP mapas cerebrales del desarrollo temprano .....	41
5. NEUROGÉNESIS, SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y DESARROLLO DE PROGENITORES .....	43
5.1. Factores que intervienen en la generación del sistema nervioso .....	43
5.2. La glía radial y migración de las células neurogliales. ....	44
5.3. Neurogénesis en el adulto: En que especies, donde y en qué circunstancias ..	45
5.3-a Receptores de nucleótidos y su efecto en la neurogénesis del adulto ...	48
REFLEXIONES FINALES .....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	53
DISCURSO DE CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA. DRA. ROSA BASANTE POL .....	73
PINCELADAS BIOGRÁFICAS .....	75
ACTIVIDAD DOCENTE E INVESTIGADORA .....	77
EL DISCURSO .....	79
EPÍLOGO .....	81

# DISCURSO DE INGRESO DE LA EXCMA. SRA. DRA. DOÑA MARIA TERESA MIRAS-PORTUGAL

## AGRADECIMIENTOS Y JUSTIFICACIÓN

**Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España,  
Excmos. Compañeros Académicos, Señoras y Señores:**

Comparezco en el día de hoy en esta sala, para leer el preceptivo discurso de entrada de un académico de número. Mi sincera gratitud a todos los Académicos de esta Real Institución y de modo muy especial a los académicos que generosamente presentaron mi candidatura. Gracias a la Excma. Sra. Doña Rosa Basante Pol perteneciente a la Sección de Farmacia; Excmo. Sr. Don Arturo Romero Salvador, perteneciente a la Sección 5ª de Ciencias experimentales y al Excmo. Sr. Don Antonio González González, perteneciente a la Sección 4ª de Medicina, que firmaron mi solicitud para optar a la vacante de la Medalla nº 26 correspondiente a la Sección de Farmacia, según resolución del 14 de junio de 2017 publicada en el BOE nº 157 del 3 de julio de 2017. A quienes agradezco profundamente su generosidad y la confianza que han depositado en mi persona. Todos ellos excelentes profesionales, buenos amigos y dignísimos académicos. También al Excmo. Sr. Dr. Don Antonio Bascones, presidente de esta Real Academia y al Excmo. Sr. Dr. Don Antonio Doadrio, presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia por su apoyo en todo momento. De modo especial mi agradecimiento a la Excma. Sra. Dra. Doña Rosa Basante, actual presidenta de la sección de Farmacia, quien me hace el gran honor de contestar a este discurso. A la que me une una profunda amistad y una forma de analizar las situaciones complejas con buena disposición y tratando de comprender las variadas razones del alma humana. Lo que es siempre emocionante, sobre todo bajo el prisma gallego-berciano pues alcanza a perfilar esos universos que la mente humana es capaz de imaginar y construir. Querida Rosa, gracias una vez más y nunca cambies.

Quiero tener en este momento, un recuerdo especial para Excmo. Sr. Don Amando Garrido Pertierra quien fue Académico de esta institución y compañero durante muchos años en la Universidad Complutense. Leones generoso de gran calidad científica y excepcional humanidad, todos sus compañeros le hemos echado de menos.

Mi agradecimiento también a las muchas personas que me han ayudado a lo largo de todos estos años en mi vida profesional, en su vertiente académica y de investigación en los diversos departamentos e instituciones donde he trabajado, El centro de Neuroquímica de Estrasburgo, la Universidad Autónoma de Madrid, la Universidad de Murcia, y la Universidad Complutense, y sobre todo a mi grupo de investigación en neurociencia, pues la ciencia es una labor colectiva, organizada, creativa, sin desmayos, siempre necesaria de innovación, de cerebros jóvenes, aunque a veces se vuelva ingrata, esquiva y avara en lo que permite desvelar. Pero, ser capaces de despejar un poco el horizonte, aunque sea solamente una mínima rendija de lo que conocemos, es una recompensa de tal valor que solamente se comprende si se ama la ciencia.

Agradecimientos desde lo más profundo de mi corazón a mi familia, a mis padres por su educación en los valores del esfuerzo, la honestidad y el amor al estudio y la naturaleza. A mi esposo Fernando Varela, gran matemático con una mente original, capaz de rebatir cualquier argumento o hipótesis que supongamos acertada, y a mis hijos Fernando y Alberto que han comprendido que la ciencia a la que se dedica su madre es importante y complicada, donde las hipótesis se aceptan solamente si hay un modelo de estudio y se demuestran.

Antes de proceder a la lectura del Discurso, rendir homenaje a mi predecesor en la Medalla número 26, el Excmo. Sr. Dr. Don Francisco Tomás Lorente, quien fue aceptado como Académico en el pleno de esta Academia de 18 de Junio de 2003. Gran conocedor de los constituyentes de productos naturales leyó su discurso el día 24 de Marzo de 2004, titulado: *“Aportación al estudio de los flavonoides”*, al que respondió el Excmo. Sr. Dr. Don Luis Cepeda Muñoz. Tuve el inmenso honor de conocer personalmente al Dr. Francisco Tomás Lorente, durante mi estancia como catedrático en la Universidad de Murcia, entre 1982 y 1986. El Dr. Lorente era un reputado farmacéutico que había introducido mejoras en numerosas técnicas analíticas, empleadas en su propio laboratorio de análisis clínicos. A petición propia pasó a super numerario en diciembre de 2014.

**Justificación del tema.** En la preparación de mi discurso de ingreso ante esta Real Institución, mi primer dilema fue la elección del tema. Los miembros de esta Real Academia son muy diversos en su formación. Eso es consecuencia de la necesidad de un conocimiento profundo en una materia específica, altamente especializada, si se quiere destacar en el ámbito profesional y disfrutar de un cierto éxito. Esa altísima especialización se hace todavía más patente, en el área científica y ha sido el paradigma de la construcción de la ciencia en este último siglo. No obstante, observamos cada vez con mayor frecuencia que los resultados más novedosos suelen darse en las intersecciones de las diversas áreas científicas, donde la puesta a punto de las tecnologías más avanzadas consiguen romper las barreras que limitan la observación y estudio de los fenómenos en las ciencias de la vida y de la tierra.

También ocurre con cierta frecuencia que los científicos una vez alcanzadas sus metas, sienten añoranza del mundo exterior y el enriquecimiento que supone el salir de los propios muros impuestos por la especialización. En ese momento se enfrentan, o nos enfrentamos, a comparar los respectivos lenguajes que hacen herméticos los conocimientos, pero que deben de ser derribados, pues todo saber tiene el mismo origen.

La curiosidad humana es el sustrato universal del conocimiento y la educación bien orientada en su contenido es el mecanismo por el cual las sociedades humanas avanzan, transmitiendo a las futuras generaciones códigos de muy diversa naturaleza. Hay códigos tecnológicos y códigos sociales que vamos renovando de modo paulatino pero constante, unos están estrechamente asociados con los otros, o se derivan de ellos. Todo ello amalgamado con la creación de un lenguaje preciso y de una mitología poderosa y unificadora que proporciona los estereotipos a los que admirar e imitar. ¡Ciertamente que nuestro cerebro es portentoso! Y nuestro universo planetario humano es la suma de todos los cerebros que han existido, existen o existirán.

Por todo lo anteriormente expuesto, espero consideren suficientemente justificado el tema objeto de este discurso, que lleva por título: ***Los receptores de nucleótidos: piezas clave en la formación del sistema nervioso.***

# LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS: PIEZAS CLAVE EN LA FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

*“El saber es el único espacio de libertad del ser”.*

Michael Foucault

## 1. INTRODUCCIÓN

Nuestro planeta tiene aproximadamente unos 4.550 millones de años y unos 750 millones de años más tarde aparece ya la primera célula primitiva. Lo que supone unos 3.800 millones de años desde la aparición de la vida en la tierra. Como fueron los procesos iniciales es motivo de especulación, pero sí que conocemos hoy día que dada una serie de moléculas simples son capaces de interactuar y asociarse, con más o menos facilidad, según las temperaturas, la intensidad de las radiaciones o la presión. Para mí, es un ejemplo asombroso, desde mi niñez, que el agua sea capaz de organizarse en esas esplendorosas estructuras conocidas como copos de nieve, o los cristales con crecimientos geométricos precisos, fractales, cuando la capa de escarcha se forma sobre las superficies frías. Es de suponer que en ambientes adecuados otras moléculas sean capaces de organizar estructuras mucho más complejas.

Alexander Oparin, un biólogo y bioquímico soviético, planteó el origen de la vida como una consecuencia de las condiciones de la Tierra primitiva y la capacidad de interacción de los elementos químicos presentes en ella. Esto llevaría a una serie de procesos evolutivos que se irían superponiendo y desarrollando a la vez. La pregunta inicial es ¿de dónde, cómo y cuáles son las primeras moléculas orgánicas componentes de nuestras células? Era necesario para confirmar la teoría desarrollar un modelo para responder a estas preguntas. El primer abordaje experimental lo realizó hace 100 años, en 1920, Stanley Miller. Supuso que la atmósfera de la Tierra en la etapa remota de formación del planeta contenía  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$  y pequeñas cantidades de  $\text{SH}_2$  por la actividad elevada de los volcanes. Introdujo estos compuestos en una ampolla de cristal, con agua y sometidos a descargas eléctricas. El análisis posterior demostró la presencia de prácticamente todos los aminoácidos y ácidos orgánicos sencillos, así como las bases purínicas y pirimidínicas, muy abundantes y diversas. Estos experimentos se realizaron posteriormente con múltiples variantes en la composición de las moléculas inorgánicas, también con variaciones en los estímulos catalíticos, como la incidencia de la luz ultravioleta, o la presencia de arcillas con diferentes metales catalizadores, consiguiéndose prácticamente todos los componentes primarios de las células vivas, incluidos polímeros, que son análogos para procariotas y eucariotas. Además, al estar formados por los elementos más abundantes en la litosfera, los seres vivos somos hijos de la tierra y nunca vamos a carecer de los sillares que nos constituyen (Miller SL. 1953).

La segunda cuestión plantea la formación de macromoléculas y la capacidad de auto replicarse, aspectos que en todos los sistemas vivos requieren ácidos nucleicos, que están formados por polímeros de nucleótidos. Es esencial ser capaz de hacer nuevas copias, incluida una cierta imprecisión, ya que son los errores lo que permite la variación y por lo tanto la capacidad de evolucionar. El gran paso adelante en la comprensión de este fenómeno fue realizado al principio de los años 1980 por Sid Altman y Tom Cech, quienes descubrieron las propiedades catalíticas del RNA, dando lugar a una extendida teoría de que los primeros organismos vivos, manejaban su información y replicación con el RNA (Altman S. 2000; Cech TR. 1990). Ambos investigadores recibieron el Premio Nobel en 1989. Hoy en día tenemos amplios vestigios de ese primer mundo, que permanece funcional en importantísimas actividades celulares. Citemos solamente las más relevantes:

- A. En el núcleo celular de los eucariotas es necesario el procesamiento de los RNA mensajeros mediante los RNA catalíticos del espliceosoma.
- B. La actividad de los ribosomas y la formación de los enlaces peptídicos de las proteínas por el RNA catalítico de la subunidad grande ribosomal. Son estas las macro factorías que definen las células tal como las conocemos.
- C. La función de la telomerasa, enzima que utiliza un RNA molde para fabricar los extremos de los cromosomas y evitar su envejecimiento. Descubrimiento realizado por Jack Szostack, Carol Greider y Elizabeth Blackburn quienes recibieron conjuntamente el premio Nobel en el año 2009.
- D. Tenemos todavía pendiente la función de los cuerpos de Cajal, que sin duda enriquecerán las funciones de los RNA en el mundo primigenio, pero aún se necesita mucho trabajo para elucidar plenamente su función.

Me gustaría finalizar este apartado destacando que este año 2019, celebramos el 90 aniversario del descubrimiento del RNA; el 62 aniversario de que el RNA era capaz de llevar información genética; los 50 años del descubrimiento de sus propiedades catalíticas y a partir de ahí la explosión de los estudios de procesamiento de RNAs, desde el espliceosoma, los RNA de interferencia, los microRNA, etc. Señalar, que también este año, la colección de libros del *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, publicará la quinta edición totalmente remozada del “*RNA world*”. En este volumen, las nuevas tecnologías del CRISP para editar RNA funcionales y la crio-Electron Microscopy (Crio-EM) para visualizar los grandes complejos de proteínas y RNA, denominados complejos RNP, que se resistían a su estudio por cristalografía de rayos-X, rinden cuenta de los grandes avances conseguidos. No olvidemos que cada uno de los espliceosomas nucleares tiene el tamaño aproximado de un ribosoma funcional.

El tercer escollo que la vida tenía que salvar era la formación de una membrana protectora y la evolución del metabolismo para que fuera suficientemente eficiente. Una vez obtenido el Premio Nobel por los estudios sobre telomerasa, Jack Szostack, se dedicó, desde



entonces, a demostrar, según sus palabras, que *“La vida sintética es posible y en mi laboratorio tratamos de crearla”*. En su trabajo no se plantea esta cuestión desde la epistemología o la bioética, sino que se centra específicamente en el camino que prepara la química para servir a la biología. Actualmente su trabajo está centrado en los procesos de formación de una membrana aislante, pero al mismo tiempo suficientemente permeable a las moléculas del entorno, ya que es indispensable para explicar la compleja organización de un ser vivo autónomo (Joyce GF & Szostak JW. 2018; Szostak JW. 2018).

El cuarto escollo, se centra en cómo conseguir mantener la vida y como organizar su metabolismo incipiente con la coordinación de todos los procesos dentro de las membranas. Se supone que las células se originaron en un ambiente acuoso en ausencia de oxígeno, posiblemente un charco costero, una charca arcillosa, como un lodazal, donde las moléculas orgánicas eran abundantes y existirían sales de diversos iones metálicos que podrían actuar como catalizadores, entre ellos el magnesio y el hierro, en menor medida el cobre, el manganeso o el zinc, con pinceladas de cobalto y selenio; además, las partículas inorgánicas servirían para adherir las moléculas orgánicas prebióticas y de este modo aumentar la concentración de las mismas en una superficie lo que resulta en un incremento de la concentración de un orden de magnitud, ya que considerando un radio de 10 en una esfera, supone un 100 ( $r^2$ ) en la superficie y un 1000 ( $r^3$ ) en el volumen. También las zonas de los volcanes submarinos son potenciales zonas de origen de la vida. De sus fumarolas emana una gran cantidad de sulfhídrico,  $\text{SH}_2$ , que contiene un gran poder reductor y funciona como fuente de energía. Pero el manejo de la energía requiere un intermediario entre el poder reductor y su empleo y almacenamiento dinámico.

Para nosotros es esencial la generación y la utilización controlada de la energía obtenida del metabolismo y los nucleótidos, derivados de las primeras moléculas prebióticas de estructura purínica, fueron los seleccionados. El nucleótido seleccionado más importante resultó ser la adenosina 5'-trifosfato (ATP), que sigue siendo en nuestros días la molécula sobre la que gira de modo totalmente esencial el control metabólico de todos los organismos vivos, ya sean aerobios o anaerobios. De todos modos, la mayor eficacia de los organismos aerobios en la producción y control de este metabolito ha permitido la vida con la complejidad que conocemos hoy en día. Los organismos aerobios somos el resultado de la primera contaminación a gran escala de la atmósfera terrestre, que no es otro que la consecuencia de la capacidad fotosintética de las cianobacterias, capaces de utilizar la energía solar, para obtener poder reductor del agua liberando el oxígeno como subproducto. El inicio de este proceso es discutido, pero las dataciones de depósitos de manganeso, cuyas sales actuaban de reductores originando depósitos del metal, indican una antigüedad aproximada de 2.415 millones de años (Kasting & Siefert. 2002)

El nucleótido, adenosina 5'-trifosfato, conocido comúnmente por sus siglas, ATP, al que dedicaremos gran parte de este discurso, fue descubierto en 1929 por dos grupos independientes el de Lohmann en Alemania y el de Fiske y SubbaRow en Estados Unidos. La introducción del concepto de enlace fosfato de alta energía, en un alarde de imaginación, al introducir un nuevo paradigma, se debe a Lipman. Desde entonces el ATP se exhibe

como el eje central de la bioenergética celular, demostrando la estrecha conexión entre la bioquímica metabólica y la biofísica (Lipman 1941).

La importancia de todos los nucleótidos en general para generar las estructuras celulares, cromosomas, ribosomas, espliceosomas, etc, y sobre todo el papel del ATP como árbitro de la bioenergética y del metabolismo celular, fueron y son objeto de numerosos estudios, restringidos durante mucho tiempo al ámbito intracelular. Tan importantes son estas funciones que se consideró como grave heterodoxia cualquier posibilidad de que el ATP pudiera actuar como molécula con función extracelular.

La negación de cualquier posibilidad de actividad extracelular del ATP era absoluta y considerada un dogma. Cualquier evidencia era rechazada automáticamente hasta que se caracterizaron los receptores de membrana y sus múltiples acciones fisiológicas. La existencia de dogmas inamovibles es contraria a la ciencia, pero muchas veces están enraizados profundamente y es necesario esperar hasta que la evidencia experimental acumulada se imponga. Es solamente una cuestión de tiempo.

En el año 1989 la New York Academy of Sciences, da un rotundo espaldarazo al área purinérgica, y más específicamente a los nucleótidos, organizando un congreso titulado "*Biological Actions of Extracellular ATP*". Destacar que en ese momento aun no se había clonado ningún receptor de nucleótidos. El gran pionero y paladín en la caracterización de los receptores de nucleótidos, siendo el ATP el agonista más reconocido, fue el Profesor Geoffrey Burnstock (bibliografía Burnstock G. para revisiones). Hoy en día, el área purinérgica es una de las más fértiles en todos los campos de la ciencia básica a la fisiopatología donde está casi todo por descubrir y en los intentos de la farmacología de dar soluciones a problemas tan importantes como la prevención del ictus y los nuevos tratamientos para el dolor.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS Y SU ORIGEN EVOLUTIVO

Después de tantos años menospreciando la actividad extracelular de los compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos, y sus derivados, ya fueran bases, nucleósidos o nucleótidos, el panorama es actualmente luminoso. Desde los inicios del descubrimiento de los neurotransmisores, existía una constante: los compuestos inicialmente utilizados para la función de señalización extracelular deben de ser abundantes, como es el caso de los aminoácidos neurotransmisores -glutamato, glicina, etc.- O bien originados mediante reacciones muy sencillas, que ya de por sí fueran factibles de modo espontáneo, como es el caso de las descarboxilaciones de los aminoácidos que están en el origen de todas las monoaminas cerebrales (histamina, serotonina, dopamina etc...) procedentes respectivamente de los aminoácidos histidina, triptófano y tirosina. Aunque ahora cuenten con sus respectivas rutas enzimáticas y realicen otras modificaciones más complejas.

Los razonamientos expuestos implicaban una obstinación y cabezonería ridícula contra el ATP, por parte de una comunidad científica que tenía terror a que el ATP, la molécula mítica y sagrada intracelular, pudiera salir a realizar otras funciones supuestamente más modestas. Este nucleótido alcanza concentraciones de hasta 10 mM en el citosol del músculo y en las células nerviosas, entre otras, alcanzando hasta el 0,1M dentro de vesículas de secreción. Por lo tanto se cumple que lo que es muy abundante dentro, tiene la posibilidad de ser activo fuera, simplemente por su disponibilidad.

Actualmente sabemos que los compuestos purinérgicos se encuentran entre los mensajeros químicos más primitivos y también más abundantes en el reino animal. La carencia de una farmacología y el hecho de que los nucleótidos en contacto con las células o en el plasma sanguíneo sean rápidamente degradados, obstaculizó el avance de su caracterización, mientras que el producto de hidrólisis extracelular, la adenosina, se reafirmó rápidamente como un mensajero, o neuromodulador. Hare una mención más amplia de la adenosina, pues no será desarrollada en posteriores epígrafes.

### 2.1. El nucleósido Adenosina y sus receptores

La adenosina es el último metabolito extracelular del ATP, y tienen sus propios receptores antes denominados P1, Purinérgicos tipo 1, que pertenecen al gran grupo de receptores metabotrópicos de 7-hélices transmembranares. En la clasificación actual se denominan familia de receptores tipo A, que consta de 4 subtipos, A1, A2a, A2b y A3. Los de tipo A1 y A3 están acopados a la inhibición de la adenilato ciclasa, mediado por las proteínas Gi. En el caso de los receptores A2a y A2b activan la adenilato ciclasa por estar acoplados a proteínas Gs (International Union of Adenosine Receptors Nomenclature, 2011).

Bertil Fredholm del Instituto Karolinska, fue uno de los investigadores más activos del área y el hecho de que la cafeína fuera un poderoso antagonista de todos los receptores de adenosina descubiertos, abrió las puertas a una nueva diana farmacológica. Citaré solo la

revisión en español, publicada en la Real Academia Nacional de Farmacia, como parte de su discurso de entrada en la RANF (Fredholm, B. B. 2003).

La adenosina es nuestro tranquilizante natural, tiene una amplísima farmacología, destacando su empleo en el tratamiento de la taquicardia supraventricular. La aceptación por parte de la FDA en 2008 del análogo, conocido como *regadenoson*, para sustituir a la adenosina en los estudios para evaluar la función cardíaca y sus ventajas por los menores efectos secundarios, abrió nuevas expectativas a la farmacología de la adenosina y sus derivados. Igualmente la existencia de receptores de adenosina, A2a, formando heterodímeros con los de dopamina, ofrece nuevas perspectivas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Cunha RA. 2016).

El caso de la cafeína tiene otras connotaciones, ya que es un poderoso estimulante del sistema nervioso. Los europeos y americanos ingerimos entre 0,3 -0,5g diarios, ya que una taza de café contiene aproximadamente- 100mg, dependiendo de las variedades y el método de extracción, según datos de la FDA. El comercio del café es uno de los más importantes después del petróleo y su clasificación oscila entre “fármaco, droga de abuso o alimento”.

Tenemos otro elemento en juego, la cosmética, que es una ingente fuente de ingresos y sometida a controles menos rígidos. No olvidemos que nuestros adipocitos expresan en sus membranas el receptor A1, que al reducir las cantidades de AMPc impide la activación del enzima triglicérido lipasa. Las cremas adelgazantes incorporan cafeína como compuesto activo, que al ser absorbida por la piel, al frotar, antagoniza los receptores A1 y se incrementan los niveles de AMPc, como consecuencia aumentando el metabolismo periférico de los triglicéridos. Señalar que las mujeres generalmente tenemos mayor número de adipocitos subcutáneos que los varones y, además, de mayor tamaño. España es una potencia mundial en cosmética y una de nuestras exportaciones más apreciadas y generadoras de riqueza. El mundo del café y su molécula efectora señera, la cafeína, tienen todavía mucho que contar y se merecería un discurso absolutamente dedicado, pero mi pequeño mundo de investigación es el de los nucleótidos, sus receptores y su función.

## **2.2. Los receptores de nucleótidos, naturaleza, familias y función**

Los receptores de nucleótidos se clasifican en dos grandes familias, una metabotrópica de siete hélices transmembrana, P2Y, y otra ionotrópica P2X (Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. 1995). Las técnicas de biología molecular permitieron clonar e identificar los miembros de estas familias, que son muy recientes. Por lo que, primero se identificaron los receptores en mamíferos, y después se procedió a estudiar lo que pasaba en otras especies por analogía de secuencia o estudio comparativo de genomas.

### **2.2-a Los receptores P2Y**

Los dos primeros receptores metabotrópicos de la familia P2Y fueron clonados en 1993. El P2Y1 fue clonado de cerebro de pollo por Tania Webb, una australiana del grupo de Eric

Barnard en Cambridge (Webb et al. 1993). Curiosamente, se describió como un receptor de ATP, aunque hoy sabemos que su agonista pleno es el ADP, siendo el ATP un agonista parcial. El receptor P2Y2 fue clonado por Lustig del grupo de Julius en California (Lustig et al. 1993), ambos, el UTP el ATP son agonistas plenos en la mayoría de los mamíferos sobre este receptor inicialmente denominado receptor de pirimidinas. Posteriormente se ha identificado hasta un total de ocho receptores metabotrópicos, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14). Los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 reconocen a los nucleótidos de uracilo, UTP y UDP, según el subtipo y la especie animal. El receptor P2Y14, reconoce los azúcares activos, como el UDP-glucosa o la UDP-manosa, etc.

Los receptores P2Y1, P2Y12, P2Y13, se consideran receptores de ADP que es su agonista fisiológico. El P2Y12 clonado por el grupo de Julius en California en 2001. Al mismo tiempo se aisló de células de la médula ósea, precursoras de los linajes sanguíneos, de pacientes que tenían defectos suaves en la coagulación y se demostró la primera enfermedad hereditaria relacionada con receptores de nucleótidos. Se demostró su presencia en plaquetas, su papel fundamental en la agregación plaquetaria y al mismo tiempo, la primera enfermedad genética asociada a un receptor de nucleótidos (Hollopeter et al. 2001). El P2Y12 es actualmente una portentosa diana farmacológica, ya que se encuentra en gran abundancia en las plaquetas y su activación por el propio ADP liberado de las vesículas plaquetarias, induce la formación del trombo. En este mismo artículo se describe que el clopidogrel, compuesto comercializado como plavix, un medicamento huérfano, pues no se conocía su diana farmacológica, pero muy eficaz para evitar la formación de trombos y prevención del ictus, era un antagonista del receptor P2Y12. Curiosamente era además un pro-fármaco ya que tenía que ser metabolizado en hígado previo a su acción sobre el receptor. Toda una lección de farmacología que constituye por sí mismo un tratado de las posibilidades y vericuetos de los fármacos. Este hallazgo permitió a la industria farmacéutica desarrollar todo un arsenal de compuestos para inhibir competitivamente o de modo irreversible el receptor de ADP, P2Y12, y prevenir el ictus y el infarto, reduciendo la formación de trombos (Baqui Y and Müller CE 2018).

El P2Y13, es muy abundante en el tejido nervioso y nuestro grupo ha trabajado intensivamente estos últimos años, demostrando que actúan como neuroprotectores en los procesos de estrés oxidativo y genotóxico, empleando en estos procesos nuevas cascadas de señalización. Entre ellas la activación y control de la expresión de las fosfatasa que revierten las señalizaciones las Fosfatasa duales, las cuales eliminan la fosforilación en residuos serina /treonina y en tirosina (Alves M et al. 2017; Espada et al. 2010; Fonseca B, 2017; Miras-Portugal MT, 2016; Miras-Portugal et al. 2018; Morente et al. 2014; Paniagua-Herranz L. et al. 2017; Pérez-Sen et al. 2017; Través et al. 2013). El receptor GPR17, que tiene una cierta analogía con los P2Y, hasta ahora huérfano, ha sido propuesto como diana del AMP, aunque no existe todavía un consenso sobre el agonista fisiológico. La importancia de este receptor se debe a su gran potencialidad en medicina regenerativa, sobre todo en los procesos de esclerosis múltiple, ya que induce la proliferación y diferenciación de la oligodendroglía que es necesaria para la remielinización de los axones del Sistema Nervioso central (Fumagalli et al. 2017).

## 2.2-b Los receptores P2X

Los receptores de nucleótidos ionotrópicos, son conocidos como familia P2X. El primer miembro clonado, el P2X1, lo fue en 1994, justo un año después de los primeros metabotrópicos. Realmente lo que se clonó fueron siete subunidades P2X1- P2X7, que pueden formar homotrímeros o heterotrímeros, según las subunidades. Todas las subunidades P2X presentan unas características similares y totalmente diferentes de los primeros receptores de neurotransmisores operados por ligando que abren canales iónicos, como los nicotínicos de Acetilcolina, los de GABA, o los de glutamato. En este caso, los receptores P2X solamente tienen dos hélices transmembrana, con el terminal amino y carboxílico orientados hacia el interior de la célula y un gran dominio extracelular uniendo las dos hélices transmembrana, en donde hay una abundante presencia de enlaces disulfuro que ayudan a mantener la estructura. Además, se necesitan solamente tres subunidades para formar el poro iónico, mientras que en el resto de receptores de neurotransmisores se necesitan 5 o 4 subunidades, como son respectivamente la familia de los nicotínicos y la de glutamato (Hattori M, Gouaux E. 2012).

La primera subunidad clonada fue la del P2X1, que forma el receptor funcional con tres subunidades idénticas. Se aisló por primera vez del vaso deferente por el grupo de Gary Buell que trabajaba para la industria en el Glaxo Institute for Molecular Biology, en Ginebra, Suiza (Valera et al. 1994). El ATP es el agonista fisiológico, responsable de abrir el poro que es permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Na}^+$ . En nuestro grupo hemos demostrado que los diadenosina polifosfatos, Ap4A y Ap5A, almacenados en las vesículas de secreción neural y neuroendocrina, tienen mucha mayor afinidad como agonistas, siendo activos a concentración nanoMolares. Al ser compuestos que nuestras propias células sintetizan y almacenan conjuntamente con el ATP en las vesículas de secreción, deben de ser considerados igualmente agonistas fisiológicos (Klishim, 1994; Miras-Portugal et al. 1996; Pintor & Miras-Portugal 1995 a; 1995b; Pintor et al. 1993; 1995, 1997). Los diinosina polifosfato, IpnI, sintetizados en nuestro departamento por el Dr. Javier Gualix, sobre todo el Ip5I, tienen un poderoso efecto antagonista sobre los receptores P2X1, por lo que uno de los modelos de estudio para conocer su efectividad ha sido el del vaso del conducto deferente de mamíferos (Hoyle CH. et al. 1997).

Las siguientes subunidades en ser clonadas fueron la P2X2 y la P2X3, que son muy abundantes en el sistema nervioso y pueden formar heterotrímeros. Se localizan en las terminales sensitivas de los nervios periféricos y en las conexiones de las astas dorsales de la médula espinal y están implicadas en el dolor neuropático y alodinia (Arribas-Blázquez et al. 2018). Los dinucleótidos de adenina, ApnA, son agonistas, junto con el ATP, siendo inhibidos al igual que los P2X1 por los diinosina polifosfatos, Ip4I e Ip5I (Pintor et al. 1997; King et al. 1999). Recientemente el grupo del Dr. Artalejo ha demostrado la importancia del receptor P2X3 en el dolor neuropático y el efecto mitigador mediado por los diinosina polifosfatos (Arribas-Blázquez M. et al. 2018).

Las subunidades P2X4, se encuentran en ganglios, en las células sensitivas del oído, en el plexo mesentérico; y muy abundantes en la vejiga urinaria. Recientemente, ha adquirido

relevancia al relacionar su función con el control de la activación de microglía y favoreciendo la remielinización de los axones centrales en la encefalitis autoinmune (Tsuda M. et al. 2003). La potenciación de la señalización por el receptor P2X4 utilizando el modulador alostérico Ivermectina, ampliamente utilizado en medicina veterinaria como un antiparasitario, favorece que la microglía adquiera un fenotipo anti-inflamatorio. Estos trabajos se han realizado en el centro de Investigación Achucarro del País Vasco, siendo Carlos Matute y María Domercq expertos mundiales en la función de la microglía y la señalización purinérgica (Zabala et al. 2018). La subunidad P2X5 es poco conocida y no entraré en detalles.

### **2.2-c El receptor P2X6. Mi homenaje a Don Santiago Ramón y Cajal**

La subunidad P2X6 ha sido difícil de asignar a una función fisiológica específica y por lo tanto largo tiempo ignorada. Ahora resurge con una potencialidad inesperada debido a su presencia en el núcleo celular. Descubrimiento realizado por nuestro grupo (Díaz-Hernández, et al. 2015). Cada vez son más los enzimas, receptores, además de los clásicos factores transcripcionales, los que viajan al núcleo para efectuar regulaciones precisas en las funciones celulares. También, trabajos recientes de nuestro grupo, demostraron de qué modo alcanzaba el receptor P2X6 el interior del núcleo y su presencia aparentemente desorganizada en las células neurales inmaduras, ya sean embrionarias o producto de la neurogénesis adulta. La presencia del P2X6 con una distribución cuasi-geométrica ocurre cuando las células neurales alcanzan su madurez, ya sea de un cultivo de células embrionarias del hipocampo del embrión de ratón, o de las células madre ependimales de la medula espinal, en la reparación medular. En todas ellas el P2X6 localiza en el núcleo de la célula y ahí la función que por el momento hemos demostrado es su capacidad para interactuar con factores de procesamiento en el espliceosoma. El factor de *splicing* 3A1, es la diana a la que se une el receptor y le abre las puertas al control del procesamiento de los RNAm de modo específico en las células nerviosas, conforme avanza su maduración (Figura 1) (Díaz-Hernández, et al. 2015; Gómez-Villafuertes et al. 2015).

### **2.2-d ¿Existe alguna relación entre el receptor P2X6 y los corpúsculos nucleares, denominados cuerpos de Cajal (*Cajal Bodies*)?**

Hace más de 100 años Cajal en preparaciones de fetos de abortos espontáneos, o en niños fallecidos a muy tierna edad (1-5 meses) realizó una serie de estudios de la morfología de las neuronas, posteriormente también en otros mamíferos de muy corta edad. Observó que las neuronas jóvenes tenían un núcleo hipertrófico, con unos nucléolos también prominentes, lo asoció a la gran actividad de la neurona que necesita generar un gran número de proteínas y diversas en muy corto tiempo y dar lugar a un sistema nervioso funcional maduro. En (1903) Cajal identificó dentro del núcleo otros cuerpos esféricos mediante la tinción de plata, a los que denominó Corpúsculos nucleares asociados al nucléolo (Ramón y Cajal 1903). Estos increíbles trabajos los publicó Cajal como parte de una modestísima revista dedicada a las prácticas de los alumnos, titulado: “*Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados e invertebrados. Trab Lab Inv Biol Univ Madr 1903; 2:129-221*”.

Cuando se cumplieron los cien años del descubrimiento de Cajal se realizaron una serie de homenajes y se puso al día el conocimiento de la estructura y función de esas formaciones (Gall JG. 20; Gall JG 2003), uno de cuyos títulos era *The centennial of the Cajal body* y fue publicado en la prestigiosa revista *Nat Rev Mol Cell Biol*.

Actualmente, 116 años más tarde, en 2019, con el estudio del procesamiento de los pre-RNA en los RNA-mensajeros maduros en el espliceosoma y lo que se denomina actualmente el genoma en 3D, nos damos cuenta de la excepcional relevancia de los cuerpos de Cajal. No todas las células presentan en su núcleo los cuerpos de Cajal. En humanos están presentes en células embrionarias, fetales y en neuronas adultas, también en células cancerosas, estando ausentes de muchas células que han alcanzado su plena diferenciación en los tejidos (Pena et al. 2001; Trinkle-Mulcahy L, & Sleeman J.E (2017). El genoma humano no está ordenado al azar, la función nuclear precisa depende de ello. Se ha sugerido que estas estructuras reúnen a genes que deben de expresarse simultáneamente en un momento en que se requiere una alta actividad transcripcional, necesitando que los genes a transcribir estén físicamente próximos a los cuerpos de Cajal.

Los cuerpos de Cajal contienen diversos componentes, incluso diversos tipos de RNA y entre otras la proteína Coilina. Si expresamos un mutante de esta proteína, el efecto se traduce en un anómalo funcionamiento de las RNA polimerasas I y II, y del espliceosoma. Los cuerpos de Cajal no tienen una estructura rígida en su composición, y pueden asociarse con otras estructuras nucleares, parece pues un elemento más de mantenimiento de las estructura ribonucleoproteicas, mostrando una estrecha relación con el espliceosoma, que al final es el sistema empleado para procesar los RNAm en el núcleo de los eucariotas. El mantenimiento de la distribución espacio temporal del núcleo celular es crucial en la función eficiente del genoma, que necesita programar cada tipo de célula, su etapa de desarrollo y su estado metabólico. Se forman entonces territorios cromosomales que forman compartimentos sin necesidad de membranas y donde todo parece regirse por las interacciones proteínas-RNA, en la interfase. Claro está que las neuronas una vez alcanzada su etapa final en el desarrollo y el fenotipo asociado, estabiliza los dominios cromosomales, colocando los que no van a ser transcritos, próximos a la periferia de la envoltura nuclear y dejando expedito el espacio asociado al poro nuclear para agilizar el tránsito entre la zona central del núcleo y la zona citosólica perinuclear (Sawyer IA et al. 2016; 2017)

Un área objeto de debate es la posible asociación de la telomerasa, que podemos considerar también como una partícula de naturaleza ribonucleo-proteica con los cuerpos de Cajal, ya que ambas son proteínas que contienen RNA asociados y funcionales, al igual que el espliceosoma. En el 2012, Stern y su grupo descubrieron que la telomerasa para ser funcional requiere una proteína específica la TCAB1 y los cuerpos de Cajal, de modo independiente (Stern et al. 2012; Maida Y & Masutomi K. (2015).

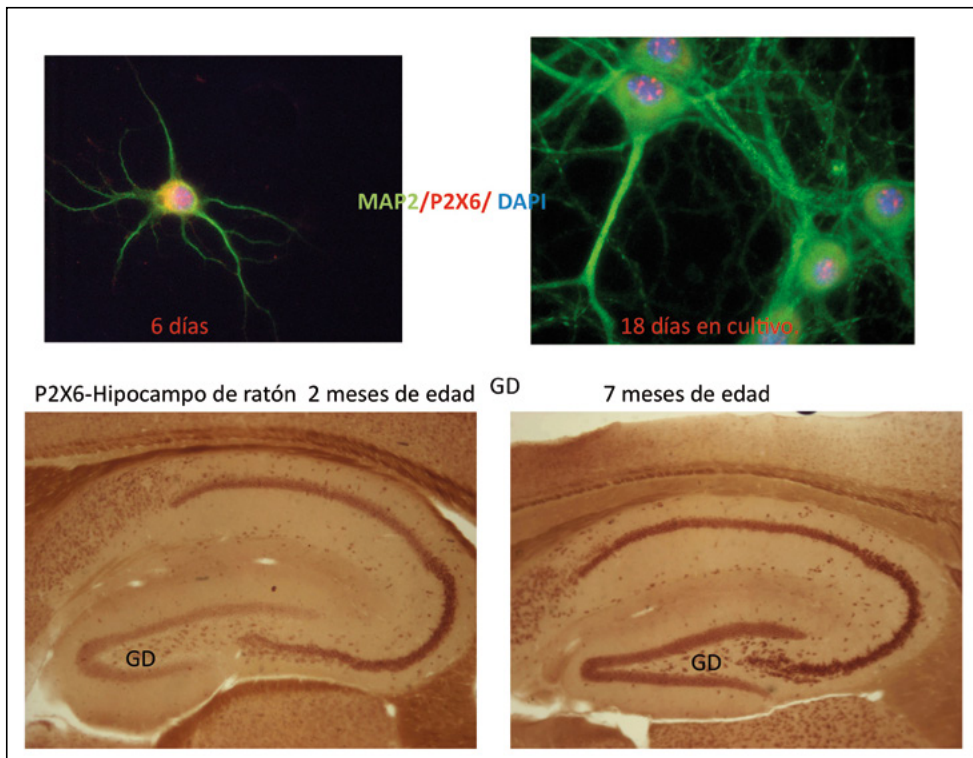
En la figura 1 podemos observar como es la distribución nuclear del P2X6 en células embrionarias, neuronas más maduras y células madre ependimarias que son inducidas tras la lesión traumática de la medula espinal. Ciertamente que hay un gran paralelismo



mo entre su distribución y los cuerpos de Cajal. Añadiendo que tienen una función de interacción con las proteínas y las partículas ribonucleoprotéicas del espliceosoma, exactamente con el factor de *splicing* 3A1 (Díaz-Hernández, et al. 2015; Gómez-Villafuertes et al. 2015). El mundo del RNA está de plena actualidad, los receptores de nucleótidos, concretamente el P2X6, están de lleno en esa dinámica, pero sobre todo el gran universo construido por Cajal, dista mucho de ser agotado. Sirva este epígrafe para rendirle homenaje.

### 2.2-e El receptor P2X7

La subunidad P2X7 fue la última en ser clonada, después de muchos intentos fallidos, su interés residía en que era muy abundante en macrófagos y relacionada con la función del sistema inmune. Actualmente se asocia con todo tipo de lesiones e inflamaciones,



**Figura 1.** Localización del receptor P2X6 en el núcleo de las neuronas e hipocampo en función del tiempo.

**Panel superior.** Cultivo primario de neuronas de hipocampo embrionarias, a la izquierda a los 6 días y a la derecha a los dieciocho días. Marcadas para citoesqueleto neural verde, núcleos con DAPI en azul y P2X6 en color rojo. La presencia nuclear aumenta con la edad.

**Panel inferior.-** Presencia del receptor P2X6 en el cerebro de ratón con la edad. Observar el cambio marcaje inmunohistoquímico del hipocampo y sobre todo del giro Dentado.

ya sea en el sistema vascular, el tejido óseo o el sistema nervioso, donde se relaciona con enfermedades neurodegenerativas en el caso de la enfermedad de Alzheimer. Son muy abundantes en células neurales, demostrado en neuronas de hipocampo y granulares en cultivo (León et al. 2006; 2007-a; 2007-b; Ortega et al. 2009; 2010). Nuestro grupo de investigación descubrió la presencia del receptor P2X7 en astrocitos, siendo el primer receptor ionotrópico P2X descubierto en este tipo de células (Carrasquero et al. 2009; Salas et al. 2013).

El P2X7 se expresa en neuronas en cultivo. Algunas de las líneas celulares utilizadas como modelo, también lo expresan conjuntamente con la proteína precursora de amiloide, APP. El procesamiento de esta proteína puede realizarse preferentemente hacia la producción del péptido amiloidogénico AB-42, o hacia otro más pequeño que no forma agregados y es por lo tanto no-amiloidogénico. Es importante destacar que la señalización celular a través de los receptores P2Y2, reduce la producción del péptido amiloidogénico, AB-42, mientras que si el receptor más activo es el P2X7, la balanza del procesamiento se desplaza hacia el incremento amiloidogénico (León-Otegui M. et al. 2011). Este descubrimiento fue corroborado en modelos transgénicos de ratones J20 con mutaciones de la proteína precursora de amiloide, APP, presentes en los portadores familiares de la enfermedad humana, el antagonista BBG, del receptor P2X7 ha resultado eficaz para reducir las placas de amiloide *in vivo*.

Señalar, como anécdota, que el BBG es un colorante azul, autorizado en alimentación humana desde 1920 y que está en todas las piruletas, y dulces de color azul y en las bebidas refrescantes de amplísimo consumo. Volviendo a la formación del péptido amiloide, para ambos receptores sus cascadas de señalización convergen en el enzima GSK-3 que es un cruce de caminos para la regulación del metabolismo, las señales nucleares de factores de transcripción y la síntesis de elementos del citoesqueleto y mantenimiento celular (Díaz-Hernández et al. 2012; Miras-Portugal et al. 2015). Las subunidades P2X7 forman homotrímeros y son una de las dianas farmacológicas que más recursos capta de las grandes compañías farmacéuticas. Recientemente, el descubrimiento de un microRNA en sangre, capaz de actuar sobre el RNAm del P2X7 y bloquear su expresión en diversas células, ha atraído la atención de los investigadores en biomedicina. El modelo en donde se descubrió fue en el de la epilepsia experimental, pudiendo este micro RNA controlar y reducir los focos epilépticos en el hipocampo. Se ha abierto con este hallazgo un nuevo modo de terapia, e incrementado, aún más, el interés de la compañías farmacéuticas por este receptor (Jiménez-Mateos et al. 2015).

De este receptor, P2X7, hablaremos ampliamente al originar los mapas cerebrales con ratones genéticamente modificados. En este caso el ratón porta una construcción con gen reportero fluorescente (E-GFP) unido al promotor del receptor P2X7 que fue amablemente cedido por Jeff Litchman de la Universidad de Harvard del proyecto Brain Connectomics a través de Maiken Nedergaard de la Universidad de Rochester USA.

## 2.2-f Origen de los receptores P2X y P2Y

Una vez que hemos descrito ampliamente la naturaleza y funciones conocidas de los receptores P2X y P2Y de mamíferos, resulta un poco fuera de lugar hablar del origen de estos receptores. La razón de este orden es debida a la gran variedad y funciones de los receptores P2X y P2Y en los mamíferos y de que fueron los originariamente estudiados. La curiosidad por la existencia de otros genes homólogos y su evolución, fomentó el estudio de su antigüedad filogenética y las funciones que realizan en otros organismos. Estudio que, aunque intenso, es todavía incompleto.

En 2009 los profesores Burnstock y Verkhatsky, en el University College de Londres, publicaron una revisión inicial compilatoria que tenía por título: *Evolutionary origins of the purinergic signalling system*. Este artículo recogía todo el conocimiento hasta aquel momento. Constataron la abundante presencia, mediante analogía de secuencias, de receptores tanto P2Y como P2X, y su capacidad de respuesta fisiológica frente a muy diversos compuestos de naturaleza purinérgica o pirimidinérgica, ya fuera en forma de nucleósidos, o nucleótidos, mono-, di-, o trifosfato. Los receptores análogos a los P2X, ionotrópicos fueron aparentemente los primeros que aparecen durante la evolución. Lo que en aquel momento no era tan esperable.

Los dendrogramas filogenéticos de los P2X fueron recogidos ese mismo año por Fountain and Burnstock (2009) en un interesante artículo titulado *“An evolutionary history of P2X receptors”*, y por Fountain SJ, (2013) titulado: *“Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology”*. Los datos principales recogidos inciden en que los receptores P2X se encuentran en todas las especies de vertebrados, lo que también confirman los análisis genómicos. Una similar situación se da en los invertebrados marinos estudiados, desde la anémona (*Nematostella vectensis*), a los moluscos (*Lottia gigantea*) y el erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*). Su función es similar a la realizada en los vertebrados, es decir, el control neural de sus músculos. Sorprendentemente no han sido encontrados en el gusano nematodo (*Caenorhabditis elegans*), ni en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y con la ayuda de la bioinformática han comprobado que no existe, en todos los insectos estudiados, semejanza alguna con los receptores P2X. La búsqueda de un grupo de receptores capaces de responder como ionotrópicos al ATP, en los insectos, se sigue buscando y posiblemente sea muy diferente desde el punto de vista estructural.

La señal del ATP en los seres vivos emerge en el albor de la aparición de las primeras células, posiblemente como una señal de peligro, indicando una rotura o destrucción celular. La capacidad de controlar la liberación de nucleótidos de modo cuantal por exocitosis vesicular, o a través de hemicanales, como las panexinas, conexinas o transportadores ABC, junto con la degradación por enzimas extracelulares, como las ecto-nucleotidasas, permitieron una gran versatilidad de la señalización purinérgica y la gran abundancia y funciones en tejidos y células, sobre todo en el sistema nervioso, que es lo que nos interesa en este discurso (Burnstock, and Verkhatsky (2012); Verkhatsky A, Burnstock G. (2014)).



### 3. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR: ¿EN QUE CONSISTE LA CO-TRANSMISIÓN?

El ATP extracelular y otros nucleótidos análogos realizan funciones como neurotransmisores y neuromoduladores en el Sistema Nervioso, a través de receptores que ya hemos definido en el epígrafe anterior como P2X y P2Y. Los criterios para ser un neurotransmisor, exigían:

- A) su almacenamiento en vesículas neurosecretoras en zonas presinápticas, para lo cual era necesario un transportador.
- B) una liberación de naturaleza cuantal que necesitaba un estímulo, dependiente de calcio, y por lo tanto excitotónica.
- C) un sistema de degradación, si no era una molécula sencilla, en este caso las ecto-nucleotidasas.
- D) Un transportador de los metabolitos originados en el espacio sináptico o perisináptico incluyendo los astrocitos, en este caso el transporte por la membrana plasmática de los fosfatos libres y el nucleósido adenosina.

Haré una referencia explícita al transporte de adenosina por su relevancia, ya que no hablaremos en extenso posteriormente. El transporte de adenosina a través de la membrana plasmática ha sido estudiado ampliamente, es muy abundante en todas las células de mamífero, sobre todo en las células neurales, su expresión está regulada por hormonas tiroideas, relacionándolo con el desarrollo y maduración cerebral (Fideu D, et al. 1994). Desde entonces se han hecho muchos descubrimientos y hoy en día conocemos que es efectuado por dos grandes familias de transportadores. La familia SLC29 es de transportadores equilibrativos ENT1 y ENT2, ENT3 y ENT4 (Sen RP. et al. 1998). La familia SLC28 es de transportadores concentrativos y necesitan la energía del gradiente de Na<sup>+</sup> para transportar al interior de las células, consta de 4 miembros: N1, N2, N3 y N4, y tienen muy variadas afinidades por los diversos nucleótidos y bases. Son muy relevantes, no solamente por su importancia fisiológica y metabólica, sino también por ser necesarios para transportar los análogos de nucleósidos y bases, empleados en el tratamiento del cáncer (Sen RP. et al. 1998; Pastor-Anglada M, Perez-Torras S. 2015). Los transportadores más antiguos son los concentrativos SLC28, ampliamente distribuidos desde las bacterias, a todos los eucariotas, exceptuando las plantas. La familia SLC29 es un poco más reciente, aunque es la más extendida entre los eucariotas.

Previo al estudio del almacenamiento vesicular del ATP, es necesario aclarar que su liberación es fundamentalmente un proceso excitotónico, cuantal en la zona sináptica (Gutierrez-Martin et al., 2011). Este proceso se produce igualmente en las células neuroendocrinas, las cromafines de la medula adrenal, las células de la hipófisis, etc. No obstante en otros tipos de células, sobre todo epiteliales o endoteliales, el ATP puede ser liberado por rotura

celular, o por sucesos fisiológicos más habituales, como el latido cardíaco. Cuya presión, repetitiva y rítmica, sobre las células del endotelio vascular humano, induce la salida a través de las conexinas o panexinas del ATP, sin excluir la salida vesicular de diversas estructuras citosólicas subcelulares (Baroja-Mazo et al., 2013). El ATP liberado, actúa entonces como un vasodilatador pues es un agonista del receptor P2X<sub>4</sub>, que a su vez activa la formación de óxido nítrico al inducir la entrada de calcio en las células de los endotelios vasculares, tapizantes de los vasos sanguíneos (Yamamoto K. et al. 2000).

### 3.1. El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT)

El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) fue el último de los transportadores vesiculares de neurotransmisores en ser identificado y clonado. En el año 2008 el grupo de Moriyama en Japón lo identificó como el producto del gen *SLC17A9* (Sawada et al., 2008). Era miembro de la gran familia de transportadores de compuestos solubles y en este caso de la subfamilia que transporta productos aniónicos que recibe el número 17 (SLC17). Esta familia contiene, entre otros transportadores vesiculares, las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato (VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3). Hasta el año 2008 se defendía fervientemente la liberación no exocitótica del ATP vía hemicanales de la membrana plasmática (Panexinas o conexinas), desde ese momento la señalización por nucleótidos en el sistema nervioso y endocrino ha sufrido un cambio radical en su concepto. Moriyama lo reivindica en un artículo de 2017 que lleva por título: *Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling*. El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT): aparición de un actor en la escena de la señalización purinérgica (Moriyama et al. 2017).

El transportador vesicular de nucleótidos tiene poca selectividad, lo que se explica por la cinética mnemónica que presenta, siendo así capaz de transportar todo tipo de nucleótidos, trifosfato, difosfato o monofosfato, incluidos los diadenosina polifosfatos (ApnA), que fueron descubiertos por nuestro grupo en 1988 y son los mejores agonistas fisiológicos del receptor P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> (Rodríguez del Castillo et al. 1988; Pintor et al 1992c; Gualix et al., 1996; 1997; 1999a; 1999b).

Hasta la fecha, se han identificado diez transportadores vesiculares de neurotransmisores, VNTs, que se han clasificado en tres subclases en función de la similitud de sus secuencias aminoacídicas y la especificidad de sustrato: las familias SLC17, SLC18 y SLC32, responsables de la acumulación de transmisores aniónicos, catiónicos y neutros, respectivamente. La familia SLC17 incluye las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*), como he citado anteriormente, el transportador vesicular de aminoácidos excitatorios/sialina (VEAT, del inglés *Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter*) y el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT, del inglés *Vesicular Nucleotide Transporter*). Además de estos transportadores vesiculares de neurotransmisores, cuatro transportadores de fosfato dependientes de Na<sup>+</sup> (NPT1, NPT3, NPT4 y homólogo NPT) se incluyen también dentro de esta familia (Anne and Gasnier 2014).

En humanos el gen SLC17A9 se localiza en el cromosoma 20 y contiene 14 exones y 13 intrones. Muestra una homología de secuencia de aminoácidos de la proteína entre el 23-29% de identidad y un 41-48% de similitud con otros miembros de la familia SLC17 (Sawada et al. 2008). En el reino animal, incluyendo vertebrados, insectos, ascidias, hidras y nematodos aparecen ampliamente distribuidas secuencias ortólogas. En los VNUT de mamífero, la mayor variabilidad se da en la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal, mientras que las regiones restantes, en particular las regiones transmembrana, están más conservadas (83% de identidad). Es interesante destacar el efecto inhibitorio del acetoacetato sobre el VNUT, que plantea la posibilidad de que la neurotransmisión purinérgica pueda ser controlada por los cuerpos cetónicos, lo que aportaría un dato relevante para comprender la diabetes no controlada. En el caso del glioxilato, un metabolito de la glicina, se ha descrito recientemente como un inhibidor selectivo de VNUT, lo que también ayudaría a comprender el efecto tóxico descrito para un exceso de alimentación con colágeno. Más recientemente se han descrito los bisfosfonatos, que se emplean en el tratamiento de la osteoporosis, como potentes moduladores alostéricos del transportador VNUT, con un mecanismo similar, es decir se unen al sitio regulador al que se une el Cl<sup>-</sup>. En esta familia de los bisfosfonatos, el clodronato es el que inhibe más selectivamente el transportador y ya ha sido empleado con éxito en el tratamiento del dolor neuropático (Hiasa et al. 2014; Kato et al. 2017; Moriyama and Nomura, 2018).

### **3.2. Vías purinérgicas y aminérgicas cerebrales. Co-transmisión**

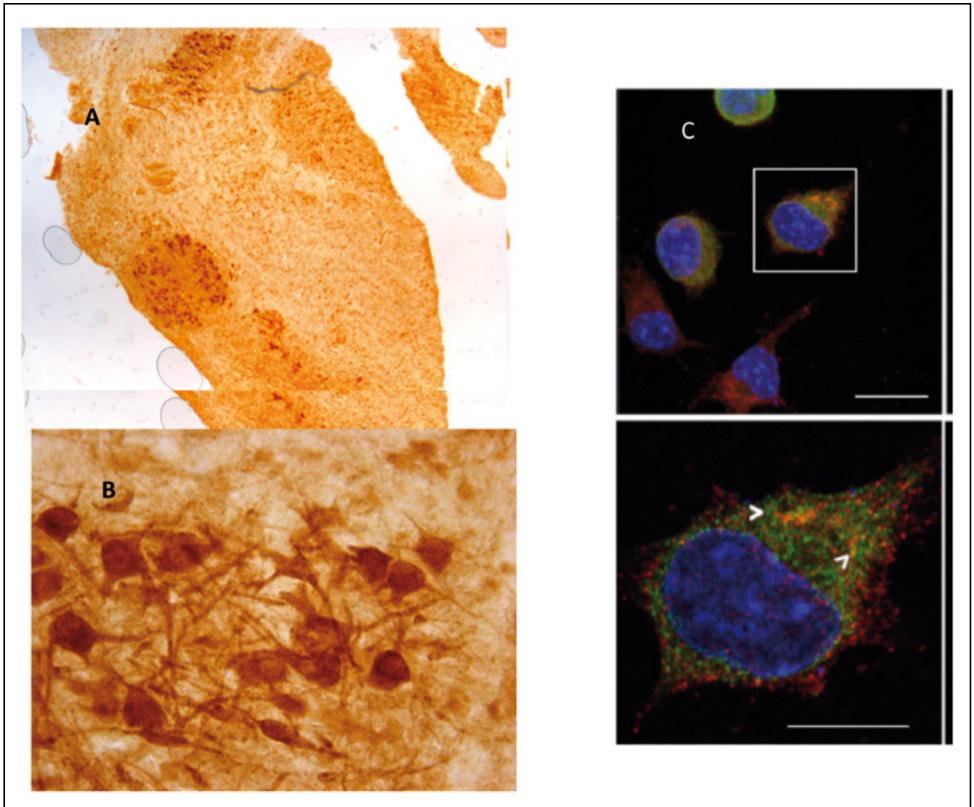
Cuando el grupo sueco de Kell Fuxe y Annica Dahlstrom, en la década de los 60 del pasado siglo, utilizando las técnicas de tinción de Falck e Hillarp, posteriormente combinadas con inmunohistoquímica, fueron capaces de resolver la localización cerebral de las monoaminas, (noradrenalina, dopamina y serotonina) y también de la acetilcolina, abrieron una ventana al horizonte de la comprensión del funcionamiento cerebral y de la farmacología (para revisión Fuxe et al. 2010). Resulta sorprendente que Cajal en su discurso de Premio Nobel en la Academia Sueca, después de mostrar su deslumbrante trabajo anatómico, dejara constancia de lo que vendría en el futuro: *“Con el tiempo, nuevas técnicas descubrirán algún proceso de coloración capaz de revelar nuevas y más íntimas conexiones entre las neuronas”* (Ramón y Cajal, 1906). Lo veremos llevado a su zenit en los estudios del conectoma humano.

#### **3.2-a Los transportadores vesiculares de catecolaminas y serotonina.**

La presencia y co-almacenamiento de ATP y otros nucleótidos con acetilcolina, las catecolaminas o serotonina era conocido desde los primeros estudios realizados en los gránulos cromafines de la medula adrenal que acumulan la adrenalina y noradrenalina; las vesículas de la unión neuromuscular que acumulan acetilcolina y las plaquetas que acumulan serotonina, más tarde (revisiones de: Winkler and Westhead, 1980; Volkandt and Zimmermann, 1986).

Actualmente, podemos considerar los mapas cerebrales de las catecolaminas, serotonina y acetilcolina, como vías de señalización del ATP, que es co-liberado conjuntamente

en la zona presináptica. Para esa co-liberación se necesita que las vesículas de secreción contengan los dos transportadores específicos, uno el del ATP y otro el de la amina, o acetilcolina, correspondiente. El primer transportador vesicular clonado fue el de las catecolaminas, en su forma VMAT1 que, como todos, pertenece a los transportadores de soluto, concretamente a la familia SLC18A1, y se identificó y clonó en 1993 por el grupo de Lee Eiden en los Institutos de la Salud de Maryland, concretamente en el de Salud Mental (Erickson JD, Eiden LE 1993). Posteriormente se clonó el VMAT2 (SLC18A2), que muestra escasa selectividad por las diferentes monoaminas, siendo absolutamente promiscuo, con casi idénticas propiedades al VMAT1, pero con una expresión muy diferente, ya que es el más abundante, sobre todo en cerebro (para revisión Schütz B. et al. 1998).



**Figura 2.** Presencia del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) en los núcleos del rafe localizados en la protuberancia, bajo el cerebelo, que son de naturaleza serotoninérgica. **A.** 4X se observan los núcleos marcados. **B.** 40 X dan una idea de la complejidad y definición del transportador de nucleótido esencial para la co-liberación del ATP y la serotonina en las células magnocelularis. **C.** Presencia del transportador vesicular de nucleótidos en un cultivo de células neurales tumorales N2a. Núcleos en azul con DAPI, demuestran que es una neurona joven recién dividida, VNUT revelado en rojo por inmunohistoquímica y sinaptofisina como marcador neuronal de vesículas sinápticas en verde.



Podemos considerar las vías aminérgicas cerebrales como vías mixtas, también purinérgicas, con señalizaciones complejas al liberar conjuntamente dos neurotransmisores uno el ATP de modo obligatorio y acompañando alguna de las aminas o la acetilcolina. Esto está muy alejado del principio de Dale, cuyo enunciado era: *Una neurona solamente puede liberar un tipo de neurotransmisor*. Fue un planteamiento simplista, pero muy eficaz para ir estudiando poco a poco los neurotransmisores que se descubrían y su actividad fisiológica y el desarrollo de los primeros fármacos. El conocimiento actual contradice totalmente este principio, e incluso las vesículas de secreción que contienen hormonas de naturaleza peptídica, como el páncreas endocrino, insulina y glucagón, las localizadas en las células de la hipófisis y neurohipófisis, así como en las neuronas cerebrales peptidérgicas, contienen ATP y la presencia del transportador vesicular, VNUT, en todas ellas. Como ejemplo ilustrativo se muestra el marcaje, con los anticuerpos del VNUT, de las células correspondientes al *rafe magnus* en un corte sagital de cerebro de ratón a nivel del cerebro medio y la protuberancia de ratón donde están los núcleos serotoninérgicos principales, que contiene serotonina. Se observan claramente las neuronas que ya había observado Cajal y a las que denominó: *neuronas gigantes de proyecciones inciertas* (figura 2).

Hoy día disponemos de radioligandos para los transportadores vesiculares de monoaminas y de acetilcolina, lo que supone un gran adelanto para visualizar los diferentes sistemas y sus anomalías en el cerebro in vivo, mediante imagen de PET (Kilbourn MR, 2012; Roy et al. 2016)

### **3.2-b El transportador vesicular de acetilcolina.**

El transportador vesicular de acetilcolina, VAcChT, (SLC18A3) fue identificado y posteriormente clonado a partir del órgano eléctrico del pez torpedo (*Torpedo Californica*), fue difícil de identificar, ya que su expresión estaba asociada con la del enzima de síntesis, la colina-acetil transferasa (ChAT). Se demostró que era muy similar a un gen homólogo del nematodo *C. elegans*, (el unc-17), que muestra un 50 % de homología de secuencia. Posteriormente se comprobó que compartía un 43 % de homología, aproximadamente, con los dos transportadores de monoaminas, el VMAT1 y VMAT2, respectivamente el SLC18A1 y el SLC18A2. De hecho los tres son miembros de la misma familia SLC18A. En este caso el transportador vesicular de Acetilcolina ha sido el tercero en ser descubierto. Los anticuerpos contra este transportador marcan específicamente las terminales colinérgicas, tanto en el sistema nervioso central, como en la periferia (Roghani A, et al 1998). Un inhibidor bien conocido de este transportador es el vesamicol (2-(4phenyl-1-piperidyl) cyclohexan-1-ol) empleado para el estudio del sistema colinérgico y la fisiología de la neurotransmisión colinérgica. Los compuestos empleados en PET para visualizar las vesículas y vías colinérgicas, han sido sintetizados a partir del vesamicol y han resultado muy útiles para detectar alteraciones en enfermedades neurales y neurodegenerativas (Kilbourn MR, 2012; Roy et al. 2016).

### **3.3. La liberación conjunta del ATP y otros neurotransmisores co-almacenados**

El almacenamiento y la liberación conjunta del ATP y las diversas aminas, plantea como están organizadas estas zonas sinápticas y que tipo de distribuciones de los subtipos de receptores están presentes. Ejemplos claros de estas sinapsis son las de la unión neuromuscular y sinapsis periféricas parasimpáticas, donde Acetilcolina y ATP actúan conjuntamente; las terminales simpáticas periféricas donde se libera conjuntamente el ATP y la noradrenalina, uno de cuyos modelos más estudiados ha sido el del vaso deferente de los mamíferos.

#### **3.3-a El modelo de estudio de la sinapsis colinérgica/ATP del órgano eléctrico del Torpedo**

En la unión neuromuscular y en las sinapsis parasimpáticas, tanto el ATP como la acetilcolina tienen receptores ionotrópicos en la zona postsináptica, los P2X1 y P2X3 para el ATP y los nicotínicos ionotrópicos para la acetilcolina, que son específicos para músculo en su composición de subunidades. Ambos tipos de receptores participan en la despolarización de la membrana muscular permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  los nicotínicos y la mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  los P2X1-3. De este modo se libera el  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y se produce la contracción muscular. En la zona presináptica hay abundancia de receptores metabotrópicos, los muscarínicos de acetilcolina y los P2Y metabotrópicos del ATP. Pero hay una singularidad, también hay receptores ionotrópicos P2X1-3 en la zona presináptica. Este hecho es especialmente relevante pues permite un circuito en el cual el propio neurotransmisor liberado (el ATP), puede actuar de nuevo induciendo la excitación de más componentes vesiculares. Sin olvidar otras funciones de regulación, como el reciclamiento de membranas y señalización retrograda hacia el núcleo, que entran de lleno en el mantenimiento sináptico.

Cuando se analiza por cromatografía de alta resolución (HPLC) el contenido de las vesículas del órgano eléctrico del pez torpedo se pueden identificar un gran número de nucleótidos, ATP, ADP, AMP, GTP, UTP y los Ap5A y Ap4A), lo que indica claramente la capacidad del transportador vesicular de nucleótidos de almacenarlos (Pintor et al 1992a;1992c).

Para limpiar la hendidura sináptica existe un amplio número de enzimas, desde la acetilcolinesterasa bien caracterizada a las fosfodiesterasas, que junto con la fosfatasa alcalina no específica de tejido, TNAP, etc... van a hidrolizar por completo todos los nucleótidos hasta los respectivos nucleósidos (Mateo et al. 1996; 1997-a; 1997-b). Estas enzimas en neuronas en crecimiento o aisladas ejercen funciones necesarias para el crecimiento y desarrollo axonal (Gomez-Villafuertes et al. 2014; Perez de Lara et al. 2018). Veremos el alcance de este hecho al analizar las terminales sinápticas del sistema nervioso central.

### **3.3-b Co-transmisión en el Sistema Nervioso Autónomo: el modelo de la sinapsis simpática del vaso deferente de mamíferos.**

En la revisión del año 2013, el Profesor Burnstock realizó un detallado análisis de la sinapsis simpática del vaso deferente (ver revisiones G. Burnstock; Burnstock G, Verkhatsky A. (2010). El empleo de muy diversas técnicas experimentales ha demostrado que el ATP es un co-transmisor excitador en los nervios simpáticos postganglionares que inervan el músculo liso, donde está co-almacenado con la noradrenalina. La preparación por excelencia para estudiar el ATP como neurotransmisor fue la del vaso deferente. En la cual Burnstock con su grupo fue capaz de demostrar que el ATP actuaba sobre un receptor ionotrópico, que inducía la entrada de calcio, para despolarizar la membrana, y la activación de la óxido nítrico sintasa, produciendo NO, originando la vasodilatación y la salida del espermatozoide, mientras que la noradrenalina actuaba a través de receptores metabotrópicos, ejerciendo a través de cascadas de señalización, una mera función moduladora. Este artículo de 1985 marca un hito en la señalización del ATP, pues es el primero en el cual se plantea la existencia de dos tipos de receptores, con dos grandes familias, los metabotrópicos P2Y y los ionotrópicos P2X. En esos experimentos quedó constancia de que el neurotransmisor poderoso y dominante era el ATP, y la noradrenalina su ayudante (Burnstock G, Kennedy C.1985).

El modelo de vaso deferente, propició la búsqueda del receptor ionotrópico de ATP, al que se denominó P2X1 (Valera et al 19994). También es un modelo muy empleado para estudiar la re-inervación simpática posterior a una vasectomía, o los efectos nocivos de la diabetes, la hipertensión y el alcoholismo sobre la función sexual (Burnstock G, Verkhatsky A. 2010).

En colaboraciones de nuestro grupo con el Profesor Burnstock, confirmamos la liberación de los diadenosina polifosfatos y su efecto agonista a concentraciones nano molares sobre el receptor P2X1, y el poderoso efecto antagonista de los Diinosina polifosfatos (Hoyle et al.1995; Hoyle et al. 1997; King et al. 1999).

### **3.4. Receptores purinérgicos presinápticos en el Sistema Nervioso Central y Co-transmisión**

Es obvio que el sistema nervioso central SNC es mucho más complejo que el SN periférico, por ello los primeros modelos de estudio fueron necesariamente en la periferia, por su accesibilidad y posibilidades de experimentación. Sabemos ya, que todas las vías centrales aminérgicas y colinérgicas son igualmente vías purinérgicas, que suelen partir de núcleos precisos localizados en el cerebro medio y la protuberancia, donde están localizados los somas de las neuronas y desde ahí envían ramificaciones más o menos abundantes y largas.

Para identificar las terminales sinápticas se utilizan los anticuerpos contra los transportadores vesiculares, y también contra los receptores específicos de membrana para conocer si ambos co-localizan. Lo que permite una diferenciación muy precisa de diversos subtipos. Por ello mediante técnicas de video microscopía funcional en señal de calcio, tras estimulación con diversos agonistas, se podía fijar el porta de la cámara de

perfusión con las terminales sinápticas adheridas, para proceder a la tinción por distintos anticuerpos. De este modo se podía conocer la naturaleza de los neurotransmisores almacenados y por otro lado los tipos de receptores presinápticos a los que habían respondido. Las posibles combinaciones son excesivamente abundantes y haremos una selección ilustrativa.

### **3.4-a Presencia de receptores P2X en la zona presináptica de terminales colinérgicos y aminérgicos**

Los primeros estudios en terminales sinápticas, analizadas independientemente, se realizaron en preparaciones de cerebro medio de rata. Se procedió a su estimulación en cámara de flujo, con ATP y diadenosina polifosfatos, una vez medida la señal de calcio, mediante video microscopia funcional. La tinción con anticuerpos y el marcador de vesículas sinápticas, la sinaptofisina, demostró que las terminales sinápticas que respondían a ATP y diadenosina polifosfatos tenían los receptores P2X1 y P2X3 (Díaz-Hernández et al. 2001-a; 2001-b). Estudios similares demostraron que el receptor P2X7 es muy abundante en las terminales sinápticas del cerebro medio y el cerebelo de rata, lo que a la larga se tradujo en estudios con animales genéticamente modificados para tratar de profundizar y buscar respuestas a ¿Cuál podría ser su significado funcional? (Miras-Portugal et al. 2003). De hecho estos receptores P2X7 están muy incrementados en cantidad y función en los ratones genéticamente modificados que llevan la mutación familiar de Huntington condicional (Díaz-Hernández et al. 2009).

Las terminales aminérgicas de los ganglios basales, identificadas por el transportador vesicular de aminas, subtipo VMAT2, después de efectuado el análisis funcional de respuesta a ATP y diadenosina polifosfatos, mediante video microscopia funcional, muestran todas ellas una robusta respuesta y la presencia de receptores P2X heterogéneos (P2X3, P2X7 etc.) (Giraldez et al. 2001).

Han sido las terminales colinérgicas cerebrales, aquellas en las que hemos encontrado resultados más relevantes. La primera razón es que ambos, el ATP y la Acetilcolina, tienen receptores ionotrópicos tanto presinápticos como postsinápticos.

Las terminales colinérgicas responden a ATP en un 63% de la población sináptica, inducen la liberación de acetilcolina y la mayoría de ellas también responden a la nicotina. Cuando se analizan los tipos de receptores presentes, los estudios inmunológicos confirman la presencia de receptores P2X3 y de las subunidades alfa-4 y alfa-7 nicotínicas, en la misma terminal, entre otras muchas posibilidades, dada la gran variación de subunidades del receptor nicotínico (Díaz-Hernández M, et al. 2004; 2006). Los receptores nicotínicos y P2X interactúan entre sí y lo hacen a través de la señal de calcio mediante el enzima calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, regulándose mutuamente (Díaz-Hernández et al. 2006). Recientemente en el hipocampo también se ha confirmado la interacción funcional entre los receptores P2X1-3 con los nicotínicos conteniendo la subunidad alfa-3 en la zona presináptica (Rodríguez RJ, et al. 2016).

Al nivel del sistema nervioso central, podemos confirmar que en las terminales sinápticas colinérgicas y aminérgicas, se libera también ATP, que puede actuar a nivel presináptico sobre receptores ionotrópicos, siendo los más abundantes el P2X1 y el P2X3, sobre todo en el cerebro del mamífero adulto y en situaciones fisiológicas. La abundante presencia del receptor P2X7 suele asociarse con eventos más complejos en situaciones tanto fisiológicas como patológicas (Díaz-Hernández M, et al. 2008; 2009; 2011). Volveremos sobre este aspecto en próximos epígrafes.

### **3.4-b Sinapsis glutamatérgicos y GABAérgicas estimulación por receptores P2X. Neuronas granulares: ¿Se almacenan conjuntamente el ATP y el glutamato?**

Las sinapsis glutamatérgicas centrales son identificadas mediante anticuerpos contra el transportador vesicular del glutamato, VGLUT, generalmente utilizamos el anticuerpo del subtipo VGLUT1, por ser el más abundante. Estas terminales, en preparaciones sinaptosomales, responden al ATP y ApnA, con señales de calcio, que además inducen la liberación del glutamato (Gualix J, et al. 2003).

Estudios en terminales GABAérgicas identificados por la presencia del transportador vesicular de GABA, hay abundante presencia de los receptores P2X1 y P2X3, capaces de inducir la secreción de GABA. Estas terminales contienen a su vez receptores metabotrópicos del tipo GABA-B que median una potenciación presináptica de los receptores P2X ionotrópicos de ATP muy acusada (Gomez-Villafuertes et al. 2001; 2003).

Se ha discutido durante mucho tiempo el almacenamiento de ATP y glutamato en las mismas vesículas. Para dar una respuesta a este problema se necesita un modelo de estudio más complejo. Optamos por las neuronas granulares del cerebelo, que son de naturaleza glutamatérgica, pues teníamos una dilatada experiencia en su cultivo. Estas células estimuladas con glutamato liberan ATP exocitotícamente, pues se necesita calcio. En el otro sentido, cuando la estimulación se produce con ATP ó benzoil-ATP, un agonista sintético del receptor P2X7, se libera glutamato también mediante exocitosis dependiente de calcio (León D. et al. 2007-a; 2007-b). Aunque, la importante pregunta de si estaban conjuntamente almacenados, en las mismas vesículas, seguía sin respuesta.

No fue hasta el año 2008, cuando Moriyama identifica y clona el transportador vesicular de ATP, VNUT, que la pregunta podría plantearse, aunque la disponibilidad de anticuerpos fiables retrasó los estudios. En la tesis doctoral de la Dra. Aida Menéndez, realizada en nuestro departamento, hemos respondido a la pregunta realizando estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos contra el transportador vesicular de glutamato y el de ATP, VGLUT y VNUT, visualizando mediante microscopia confocal. La respuesta fue compleja, ya que, en las primeras etapas de formación y desarrollo del cerebelo ambos transportadores se localizan en las mismas vesículas, pero conforme madura el cerebelo y las neuronas granulares adoptaban su morfología y localización cerebelosa, su distribución era cada vez más precisa y diferenciada del otro. La propia maduración de los cultivos de células granulares de día P3- postnatal, procedían a la segregación de los dos transportadores en

diferentes vesículas y con distribución citosólica diferente. Así pues, los dos transportadores coexistían en la misma célula, el de VNUT disminuyendo y el VGLUT aumentando su presencia con la maduración en los días de cultivo. Una situación similar ocurre cuando analizados cortes de cerebelo, con marcadores para ambos transportadores, al final del desarrollo en el ratón de 1 mes, o del adulto las vesículas marcadas con VGLUT se sitúan en la periferia y zonas presináptica, mientras que las vesículas ATPérgicas, identificadas por VNUT, tienen una mayor distribución tanto en terminales, como es dendritas y sorprendentemente en vesículas de naturaleza lisosomal, lo que indicaría múltiples funciones para el ATP liberado y no solamente en la hendidura sináptica (Menéndez-Méndez A et al. 2017). Es importante destacar su presencia en la glía de Bergman, que es la glía radial en el cerebelo y que participa en la organización y distribución de los elementos neurales durante la neurogénesis.

La respuesta a la pregunta del enunciado de este epígrafe: **Neuronas granulares: ¿Se almacenan conjuntamente el ATP y el glutamato?** : La respuesta es muy clara **cuando el cerebro ha definido la identidad de sus neuronas y su función, en este caso los dos neurotransmisores están completamente segregados, en sus respectivas vesículas.** Pero, durante las etapas de formación y desarrollo, se pasa por todo tipo de células poco diferenciadas y que no han alcanzado todavía su fenotipo definitivo, en ese momento existe una indefinición transitoria.

## 4. FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X7 Y OTROS ACTORES EN LA ELONGACIÓN AXONAL EN EL DESARROLLO Y LESIONES

La abundante presencia del receptor P2X7 en terminales pre-sinápticas del cerebro de mamíferos, sobre todo en el cerebelo de mamíferos en los primeros días post-natales, que es cuando el cerebelo se desarrolla más ampliamente, nos hacía pensar en una función durante el desarrollo y maduración del cerebro y como se origina ese ingente y preciso cableado de axones y sus conexiones.

Durante el desarrollo embrionario y fetal los axones llegan a su destino de modo preciso. No olvidemos que Cajal postulaba la necesidad de la existencia de sustancias quimio-atractivas o quimiotróficas, para alcanzar su destino. El profesor Marc Tessier-Lavigne, actualmente Presidente de la Universidad de Stanford, uno de los grandes investigadores en esta área, confirmó y completó la hipótesis de Cajal, demostrando que no solamente se necesitan quimioattractantes, sino también sustancias quimio repelentes para guiar los grandes grupos de axones que conectan los diversos núcleos cerebrales y de la médula espinal. En una fecha tan temprana como 1991, Tessier-Lavigne demuestra que la orientación de los axones *in vitro* responde a sustancias quimiotróficas de otras zonas cerebrales específicas, en combinación con otras de naturaleza repelente organizadoras de la dirección, algunas con nombres tan sugerentes como semaforinas etc (Tessier-Lavigne and Placzek 1991; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a, 1995b). Desde entonces han sido muchos los trabajos de su grupo para comprender el cableado axonal del sistema nervioso, entre ellos los axones largos de la médula espinal y la función esencial que realizan dos factores, la Netrina 1 y el receptor del “*Sonic Hedgehog*” en el ordenamiento de los axones y su perfecta distribución en la línea media de la médula (Wu et al. 2019).

Trabajos de nuestro grupo habían demostrado la presencia en terminales presinápticas de un elevado número de receptores ionotrópicos, más concretamente los ionotrópicos de ATP, P2X, que tienen preferencia por permear el ion calcio frente al ion sodio, entre ellos el P2X7 (Pintor et al. 1995c; Díaz-Hernández et al. 2002; 2006; Miras-Portugal et al. 2003). La primera cuestión es si en neuronas aisladas estos receptores tienen también una localización topológica precisa y repetitiva en la compleja arquitectura neural, que nos pueda orientar sobre su función. Para llevar a cabo el estudio sopesamos varios tipos de células en cultivo, desde las líneas celulares neurales, como las del neuroblastoma N2a, que tienen el inconveniente de su rápida proliferación, aunque resulta útil (Gomez-Villafuertes et al. 2009; 2014). El modelo las neuronas aisladas del hipocampo fetal, es difícil de realizar por su pequeñísimo tamaño, pero tiene muchas ventajas, ya que es un cultivo primario, donde las células neurales ya no se dividen y sufren cambios morfológicos acusados durante los primeros días en cultivo. Es en este modelo donde hemos podido analizar en detalle el papel del P2X7 en el desarrollo, elongación y ramificado de los incipientes conos de crecimiento, así como la presencia de otros actores que modulan o potencian ese crecimiento axonal (Díaz-Hernández et al. 2008; del Puerto et al. 2012).

Permítanme de nuevo que cite a Cajal, para ponernos en contexto, en un interesantísimo artículo titulado: *Cajal: Lessons on brain development* (de Castro F. et al. 2007), el autor hace un recorrido por el trabajo de Cajal, de modo especial por el cono de crecimiento cuya descripción publicó Cajal en dos artículos, uno de ellos en francés, en una revista de escasa difusión científica, aunque desvelara algo tan novedoso que es considerado un tesoro universal, como la demostración de la existencia de un cono de crecimiento (Ramón y Cajal 1890b; 1890c). Cajal realizó los estudios en la médula espinal de pollos de 3-4 días de vida. Lo de acudir a un modelo con animales aun inmaduros y con un cerebro en formación, fue uno de sus grandes aciertos, al evitar tejidos correosos, densos en cableado y difíciles de interpretar y teñir. En el modelo de las neuronas embrionarias de hipocampo en cultivo hemos podido mimetizar los conos de crecimiento descritos por Cajal aumentando o disminuyendo los niveles de ATP, o utilizando inhibidores, o enzimas que destruyen el ATP. Sus dibujos científicos fueron solamente superados cuando se dispuso de la microscopia confocal, con anticuerpos marcados fluorescentes.

#### **4.1. El cono de crecimiento: Mecanismos del P2X7, y de los receptores P2Y1 y P2Y13.**

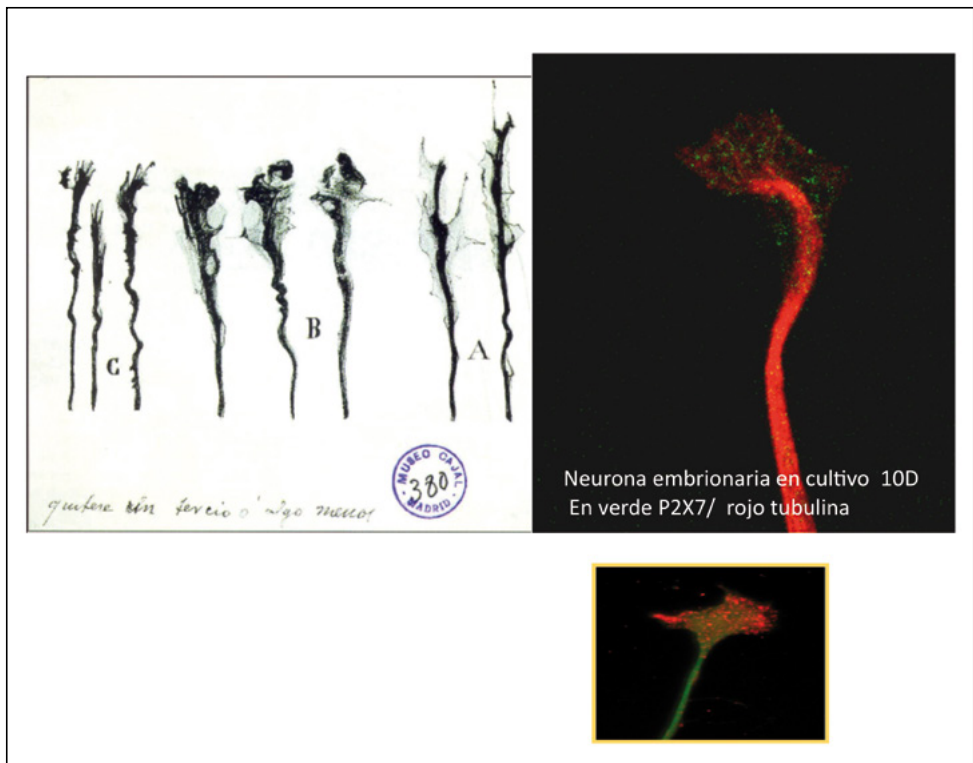
La presencia de un elevado número de receptores P2X7 en la zona distal del cono de crecimiento, nos hizo pensar que podría estar involucrado en el crecimiento del axón. Mediante estudios de videomicroscopía funcional se observa la entrada de calcio a las terminales, de modo dosis dependiente, tanto con el ATP que es el agonista fisiológico del receptor, como con el agonista de síntesis Benzoil-ATP. La entrada de calcio es bloqueada por el antagonista BBG, un colorante alimentario, conocido como azul brillante G. Actualmente disponemos de una amplia variedad de antagonistas, competitivos, como el A-438079, que es activo a concentraciones del rango nano molar, que también bloquea la entrada de calcio mediada por el receptor P2X7 (figura 3).

La masiva entrada de calcio a través de estos receptores, que además no desensibilizan, cuando se estimula con el agonista fisiológico, ATP, o con un análogo más difícilmente hidrolizable, como el benzoil-ATP, da como resultado una parada absoluta del crecimiento axonal (Díaz-Hernández et al. 2008). Nos causó sorpresa, pero ese mismo año unos meses después salió publicado un trabajo, según el cual la presencia de calcio abundante en el cono de crecimiento produce la retracción del axón (Yamada et al. 2008). La polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, es esencial para generar el movimiento ameboideo y crecimiento que al final resulta en el alargamiento del axón y el avance del cono de crecimiento. En este modelo los incrementos de AMPc que controlan los enzimas responsables de la plasticidad del citoesqueleto de actina, dependen de una adenilato ciclasa tipo 5, (AC5), propia de los tejidos neurales y localizada en la membrana plasmática del cono de crecimiento, que es la única inhibida por calcio, que entra a raudales a través de la activación del P2X7 (del Puerto et al. 2012). Esta actividad es también modulada por los receptores P2Y1, que a través de proteínas Gq, libera calcio del retículo, y ayuda en su acción al P2X7, mientras que el P2Y13 a través de Go, impide la salida de calcio del retículo, obstaculizando la actividad de la adenilato ciclasa y obstaculiza al receptor P2X7.



En experimentos de farmacología clásica, un cultivo de neuronas de hipocampo control, tienen unos axones y dendritas de determinado tamaño. En presencia de ATP, la longitud del axón disminuye y las dendritas disminuyen su arborización. Si añadimos un antagonista del P2X7, ya sea el BBG, o el A-438079, la longitud del axón es mucho mayor y la arborización dendrítica absolutamente ramificada.

Actualmente este experimento de farmacología clásica se puede sustituir por otro de biología Molecular. El bloqueo del receptor P2X7 mediante un RNA de interferencia dio el mismo resultado, demostrando que tanto la farmacología clásica, como la molecular coinciden en el resultado. El estudio de la señalización en el cono axónico, demostró que el Calcio a través del receptor P2X7 activa toda una batería de enzimas, como son la calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, y la quinasa de adhesión focal, FAK, que impide la plasticidad del citoesqueleto adherido a la membrana plasmática, entre otras muchas cascadas, donde ya hemos citado la importancia del citoesqueleto de actina.



**Figura 3.** Los conos de crecimiento. A la izquierda dibujo de Cajal de la medula de pollo de 3 días de edad y a la derecha cono de crecimiento de neuronas de hipocampo embrionario en cultivo. El receptor P2X7 en verde, punteado solo en la zona terminal y la Beta-III tubulina como marcador neural del axón. Abajo. cono de crecimiento de una neurona , con diferenciación inducida. En rojo la fosfatasa alcalina no específica de tejido, en verde la tubulina.

La idea que subyace a estos resultados, tal y como nosotros la interpretamos, es que el receptor P2X7 se comporta como una “nariz molecular”. Si no hay ATP extracelular en el entorno sigue avanzando, pues no recibe la señal de calcio, que le indique que ha llegado a su destino. Cuando alcanza la zona de sinapsis específica donde se libera ATP, La señal de calcio se hará patente y se frenará el crecimiento axonal para establecer una sinapsis funcional. Este es uno de los eventos necesarios, en medio de otros muchos factores y señales.

Los resultados con una línea tumoral, el neuroblastoma N2a, permitieron analizar en profundidad la cascada de la  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependiente quinasa II que media la inhibición de la neurogénesis en este modelo. Se confirmó también que el P2X7 activo, impide la diferenciación de las neuronas y que el uso de antagonistas puede llevar a la diferenciación y formación de axones, de gran longitud. En esta línea además se pudo analizar el funcionamiento del receptor P2X7 mediante electrofisiología, para estar absolutamente seguros de que las propiedades correspondían al receptor P2X7 y no a otro similar (Gomez-Villa-fuertes et al. 2009).

Este descubrimiento abre las puertas a paliar situaciones fisiopatológicas en donde el crecimiento o el freno de los axones es necesario. Podríamos encontrar algún modelo para estudiar si también funciona *in vivo*. Veremos que ocurre en un modelo de epilepsia.

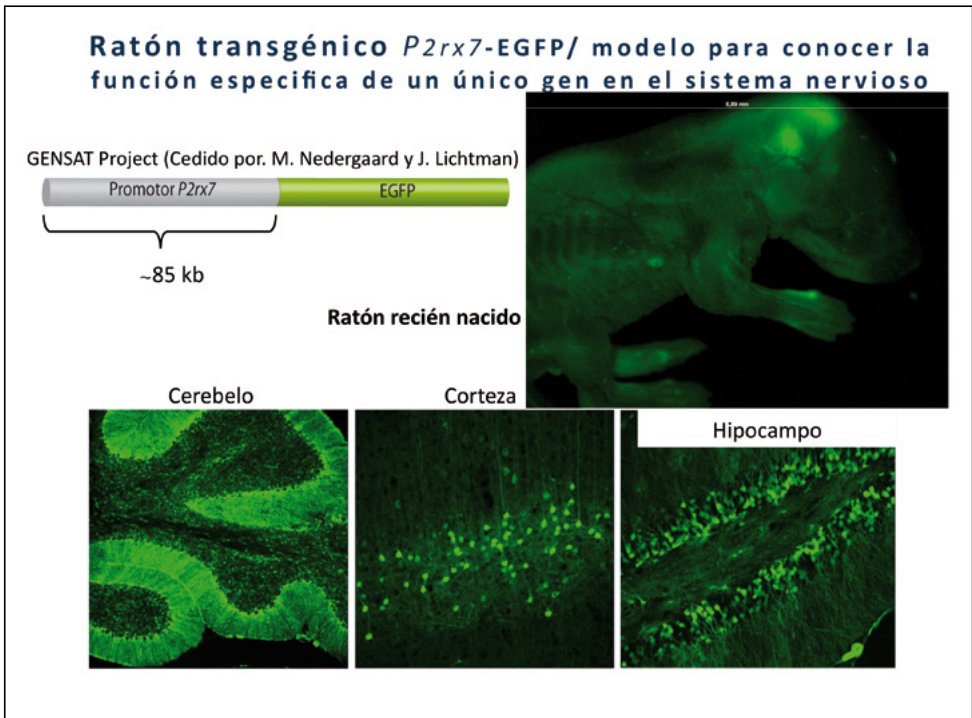
#### **4.2. P2X7 en la epilepsia por lesión del lóbulo temporal. El modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP,**

La expresión del receptor P2X7 está controlado por el factor *transcripcional Specificity Protein 1*, SP1. Este factor está implicado en funciones fisiológicas y patológicas de procesos cerebrales. El promotor del receptor murino del P2X7 contiene al menos cuatro sitios de unión para el factor SP1, que están muy conservados en todos los mamíferos estudiados hasta el momento. La mitramicina A, un antitumoral empleado en el tratamiento del cáncer, inhibe la activación transcripcional mediada por Sp1 y en consecuencia reduce los niveles endógenos del receptor P2X7, tanto en neuronas corticales como astrocitos y líneas de neuroblastoma.

El modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP, que expresa la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor del P2rx7, es una herramienta que permite conocer cómo se expresa este receptor durante el desarrollo y que sucede cuando ocurren lesiones cerebrales. La Doctora Maiken Nedergaard nos cedió amablemente el ratón con el que hemos podido realizar estudios *in vivo* de la regeneración del hipocampo dañado en el *estatus epilepticus* experimental. Este ratón pertenece a la colección de Jeff Lichtman, en la que se marcaron los promotores de múltiples genes para conocer su expresión en la etapa embrionaria, fetal y adulta. De estos ratones el más conocido es el denominado como Brainbow, ratón con cerebro arcoiris. Este es un ratón transgénico multicolor conseguido mediante una estrategia de recombinación estocástica de expresión entre varias proteínas fluorescentes. El resultado fue un sorprendente marcaje de las neuronas del ratón con múltiples colores diferentes. En nuestro caso solamente queríamos el marcaje con un reportero para un gen específico, el P2X7 (figura 4).

El ratón transgénico, P2rx7-EGFP, ha sido un poderoso aliado para conocer la importancia del P2X7 en el desarrollo cerebral y la total correlación con el factor de transcripción Sp1. (García-Huerta et al., 2012; Gómez-Villafuertes et al., 2015). En un epígrafe posterior veremos la importancia de este ratón transgénico para comprender la evolución del P2X7 durante el periodo fetal y postnatal hasta maduración total del cerebro de ratón.

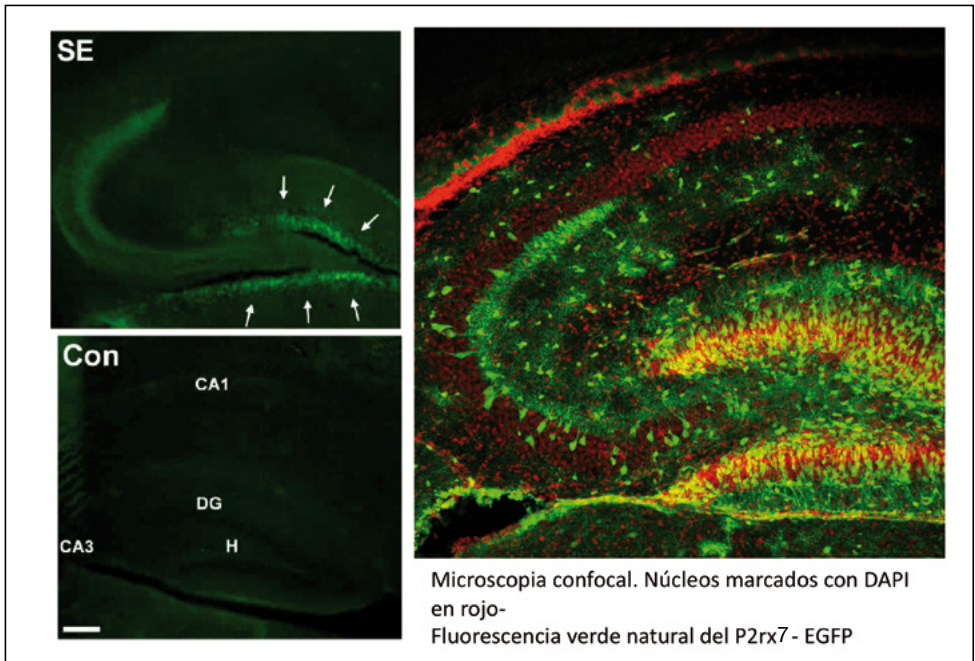
Las crisis prolongadas, conocidas como *status epilepticus*, (SE), constituyen una emergencia neurológica que puede dañar de modo irreversible el cerebro. El *status epilepticus* se origina por un fallo de los mecanismos normales para finalizar los estados de crisis. La inhibición por ácido gamma-amino butírico (GABA) y el anticonvulsivante benzodiacepina son frecuentemente completamente ineficaces. El SE experimental se puede inducir mediante una inyección de ácido kaínico intra- amígdala en el ratón, la amígdala tiene conexión con el hipocampo, con lo cual no es una lesión directa y podremos observar y comparar la evolución del estado epiléptico en cada uno de los hipocampos del hemisferio derecho o izquierdo. En este modelo se incrementan selectivamente los niveles hipocam-pales del receptor P2X7, comparado con los otros receptores. Si usamos el ratón transgé-



**Figura 4.** Ratón transgénico *P2rx7*-EGFP para conocer la función específica de un único gen en el sistema nervioso. Pertenece al proyecto GENSAT y expresa la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor del P2X7. Al nacimiento están intensamente marcados, obsérvese el cerebro y los nervios periféricos, así como el corazón. Al nacimiento, el cerebelo y el hipocampo son dos de las zonas más marcadas.

nico del P2X7 con el reportero de la proteína verde fluorescente, podemos identificar a las neuronas del giro dentado del hipocampo, en el hemisferio ipsilateral, como la mayor población de células que están transcribiendo el receptor P2X7 cuando se desarrolla el SE. El pretratamiento del ratón con una microinyección intracerebroventricular del antagonista del P2X7 A438079, reduce la duración de la crisis a menos de la mitad de tiempo y la mitad de muerte neural, el BBG también es eficaz. La inyección conjunta de lorazepam con el A438079 finaliza con el estatus epiléptico. Estos resultados son muy prometedores para desarrollar una nueva clase de fármacos antiepilépticos (Engel T. et al. 2012; Jimenez-Pacheco et al. 2013) (figura 5).

Recientemente los micro-RNA han entrado a formar parte de las posibilidades de la farmacología. En relación con el P2X7, cuyos niveles se incrementan en la epilepsia experimental, desconocemos los mecanismos exactos que controlan su expresión, solamente la regulación a través del factor transcripcional Sp1. Experimentos en ratón, sugieren que el P2X7 es la diana del microRNA-22. La inhibición y bloqueo de la expresión de este micro-RNA induce un incremento de la expresión del P2X7R y también el incremento



**Figura 5.** El ratón transgénico P2rx7-EGFP es un modelo excelente para realizar estudios en la epilepsia focal del lóbulo temporal.

Paneles de la izquierda: en este modelo se incrementa notablemente la expresión del receptor en el lado ipsilateral, pero muy poco en el contralateral. Como este ratón es fluorescente, no se necesitan anticuerpos para detectarlo.

Panel de la derecha. Se observa con gran nitidez el hipocampo y el gran número de células detectadas por sus núcleos, junto con el crecimiento de las prolongaciones axónicas y sus conos de crecimiento en busca de destino.

de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el hipocampo contralateral después de establecido el *status epilepticus*. La inyección *in vivo* del del microRNA-22 mimetiza las crisis espontaneas en el ratón en la zona contralateral. Por ahora es difícil trasladar al humano estos conocimientos, pero sin duda es otra forma de controlar la expansión de las zonas inflamables y dañadas susceptibles de hiperactividad en el cerebro (Jimenez-Mateos, 2015; Miras-Portugal et al. 2017; Beamer et al. 2018).

### **4.3. ¿Cómo consigue una neurona eliminar el ATP extracelular para evitar que los receptores P2X7 se activen?: Ecto-nucleotidasas, la TNAP**

El crecimiento axonal es esencial para establecer los circuitos neurales durante el desarrollo cerebral y también en procesos neuroregenerativos, como hemos visto en los dos apartados anteriores y señalábamos la complejidad de un proceso con múltiples actores. En este epígrafe vamos a señalar uno más, las ecto-nucleotidasas, varias familias de enzimas capaces de hidrolizar todos los nucleótidos extracelulares hasta adenosina. Por su amplitud resaltaremos el papel crucial de la fosfatasa alcalina no específica de tejidos (TNAP) en ese control preciso de los niveles de ATP extracelulares, ya que juega un papel muy relevante en las etapas embrionarias y fetales.

Los primeros estudios sobre el efecto de la TNAP en el crecimiento axonal se realizaron en el modelo de las neuronas embrionarias de hipocampo en cultivo. Este enzima se localiza en el cono axónico, estrechamente asociada con los receptores P2X7, en los primeros días en cultivo, cuando estas tienen que formar sus prolongaciones axónicas, su expresión se incrementa en orden de magnitud, tanto medida por RNA, como por cantidad de proteína o visualización en microscopía confocal. De acuerdo con esos resultados, el bloqueo de su actividad, por un inhibidor clásico como el levamisol, o mediante RNA-de interferencia resulta en una reducción drástica y absoluta de la elongación axonal (Díez-Zaera et al. 2011).

¿Qué sucede en el cerebro en las etapas tempranas del desarrollo? La presencia del receptor P2X7 desde las etapas tempranas del desarrollo, plantea la pregunta de ¿Cómo consigue crecer el axón, si hay ATP fuera de las células? La naturaleza tiene todo previsto y por ese motivo en las etapas tempranas del desarrollo, en las mismas terminales donde está el receptor P2X7 en el segmento inicial, o cono de crecimiento axonal, también está la fosfatasa alcalina no específica de tejido, TNAP. Este enzima es totalmente inespecífico y le da lo mismo a lo que esté unido el fosfato, y elimina los fosfatos de cualquier nucleótido e incluso de proteínas. Algo parecido habíamos visto en el caso de Alzheimer que este enzima que está asociado por fuera a la membrana plasmática, o soluble en el medio extracelular, era capaz de eliminar los fosfatos de la proteína *Tau* (Díaz-Hernández et al. 2010)

La aproximación experimental en el animal entero es compleja. Sabemos que en el suero fetal de los mamíferos, este enzima tiene una actividad muy aumentada, que se reduce drásticamente al tener el sistema nervioso formado. En nuestro caso elimina completamente el ATP en el entorno del P2X7, ya que ambos enzima y receptor colocalizan en estudios

por microscopia confocal, por lo que no hay ATP en el entorno el receptor para ser activado, posiblemente en los denominados microdominios. Los estudios en el animal completo hemos podido realizarlos gracias a que existe un ratón transgénico, el cual que nos facilitó amablemente el Dr. José Luis Millán, que mimetizan las mutaciones en el gen que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejidos, TNAP. Esta enfermedad hereditaria cursa con anomalías en los huesos y crisis epilépticas espontaneas. Cuando se analizan, los cerebros de los ratones transgénicos, modelos de la enfermedad, se ha visto que hay un aumento de los precursores neurales, pero un déficit en la formación y maduración de las conexiones (Sebastian-Serrano et al; 2015; 2016).

El sistema purinérgico está estrechamente relacionado con el desarrollo cerebral y la elongación axonal. Hemos visto como receptores ionotrópicos y metabotrópicos actúan de modo coordinado y además están las ecto-nucleotidasas para eliminar las señalizaciones cuando no son deseadas.

#### **4.3-a ¿Es la TNAP un nexo de unión de la señalización purinérgica con la colinérgica en la enfermedad de Alzheimer?**

Me permitiré un paréntesis en este apartado pues la fosfatasa alcalina, TNAP, ofrece un nexo de unión entre el sistema purinérgico y el colinérgico en la enfermedad de Alzheimer, ya mencionada en la acción de los receptores P2X7 que favorece las placas de amiloide y el receptor P2Y2, que favorece su procesamiento no amiloidogénico.

No todos los investigadores en Alzheimer comparten la idea de que las placas de amiloide estén en el origen de esta enfermedad neurodegenerativa. Su idea es que son los acúmulos de una proteína asociada a los neurotúbulos, la proteína *tau*, que se puede observar en el citosol formando ovillos, y salen por diversas vías al espacio extracelular, los que están en el origen de una gran parte de los casos que denominamos como Alzheimer. Existen pues dos facciones referentes al origen y causa de la enfermedad, una defensora del  $\beta$  amiloide, y otra del *Tau*.

En colaboración con el gran investigador, Jesús Avila, reconocido *taoísta*, estudiamos el efecto de la proteína *tau* y sus péptidos, sobre células neurales en cultivo, y observamos que podían actuar incrementando la señal de calcio. Los receptores, una vez caracterizados, resultaron ser los receptores muscarínicos, metabotrópicos de acetilcolina, M1 y M3, conocidos por ese nombre, ya que la muscarina, aislada de la *Amanita Muscaria*, actúa sobre estos receptores. Al contrario que la acetilcolina que rápidamente desensitiza el receptor, la proteína *Tau* y sus péptidos, mantenían la señal de calcio por un tiempo muy prolongado. Lo que produce grandes acúmulos de calcio citosólico, que son tóxicos para la célula y posteriormente pueden producir la muerte neuronal (Gomez-Ramos et al. 2008; 2009). Este descubrimiento implicaba la señalización directa de los péptidos de *Tau* sobre la neurotransmisión colinérgica. Señalización que había sido descrita, en estudios post-mortem, y se encontraba muy limitada en diversas áreas cerebrales, con especial reducción de los núcleos colinérgicos basales en los enfermos de Alzheimer, (Rossor et al. 1982).

La proteína tau en los enfermos de Alzheimer está muy fosforilada y la cuestión era si ¿Están o no, fosforilados los péptidos de tau que actúan sobre los receptores muscarínicos? La respuesta fue que necesitan estar desfosforilados. Comenzó entonces la búsqueda del enzima resultó que la fosfatasa alcalina no específica de tejido, TNAP, que está asociada a la membrana plasmática y es totalmente inespecífica es el ecto-enzima responsable de la defosforilación de *Tau*. La actividad de la fosfatasa alcalina esta aumentada en muestras de tejidos humanos procedentes de enfermos de Alzheimer cuando se comparaba con sujetos normales de la misma edad (Diaz-Hernandez et al. 2010; 2014; 2015). Era cerrar el círculo y abrirlo a muchas otras posibilidades.

Es importante comprender que la enfermedad de Alzheimer requiere un plural, hay un escaso 1-3 % de origen hereditario temprano, el resto es un cúmulo de posibilidades, con mayor o menor predisposición. Los estudios basados en modelos de la enfermedad familiar de Alzheimer, con ratones transgénicos específicos, están obviando los estudios de *Genome-wide association* relacionados endofenotipos y etapas pre-diagnóstico y dianas terapéuticas con el *big data* (Chung et al. 2017; Ertekin-Tane 2017). De los subtipos y clasificación de los pacientes con “Alzheimer”, mejor llamarlo demencias seniles, nos falta casi todo por conocer.

#### **4.4. Receptores de nucleótidos implicados en las lesiones de médula espinal**

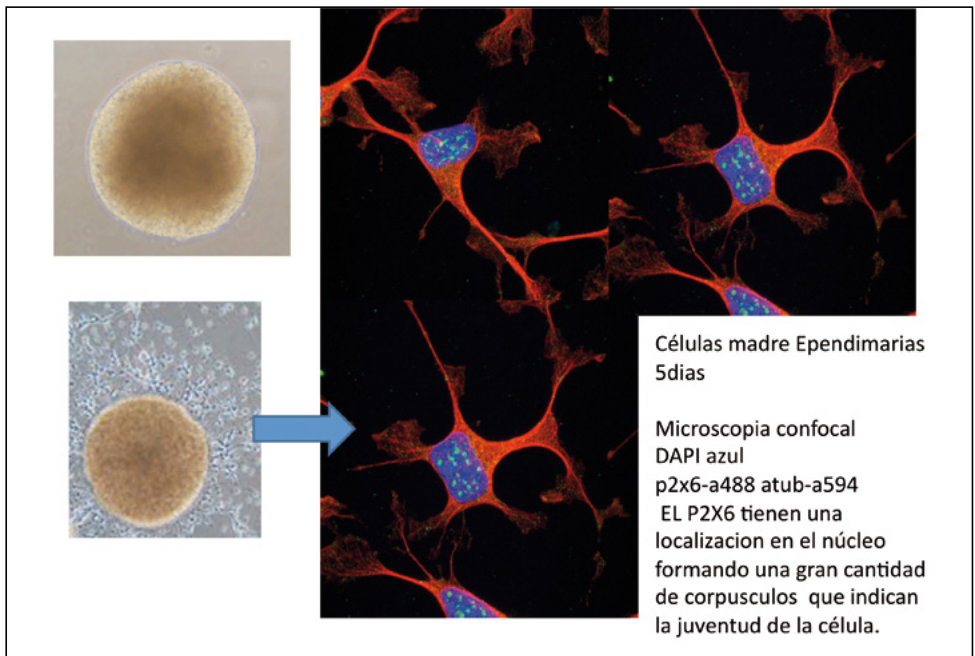
La lesión de la medula espinal es una de las mayores causas de incapacidad por lesiones del sistema nervioso central. Implica una pérdida irreversible de la zona distal a la lesión si es grave. En este caso la pérdida de la mielina origina la muerte de los oligodendrocitos, que envuelven los axones y posteriormente la pérdida de todo tipo de células tanto interneuronas de la médula espinal, como neuronas motoras (Grossman et al. 2001).

Algunos ensayos clínicos están tratando de utilizar es el trasplante de células precursoras epSPC, para las lesiones graves de la medula espinal (Mothe and Tator, 2013). Las células madre progenitoras endimales, epSPC, se encuentran en la región periventricular del canal central de la medula espinal del adulto. El cultivo de estas células origina una progenie, que es movilizadada hacia el lugar de la lesión, incluso cuando el epéndimo no está afectado. Estas células originan también oligodendrocitos y por lo tanto tienen un potencial intrínseco para reemplazar algunas de las células perdidas en la lesión. Para ello es necesario disponer de protocolos de diferenciación específicos, algunos de ellos ya desarrollados con éxito (Moreno-Manzano et al., 2009). En la lesión espinal el tejido traumatizado libera grandes cantidades de ATP y otros nucleótidos, que actuando sobre receptores específicos y coordinados con los factores de crecimiento, consiguen remodelar y reparar la lesión (Burnstock and Ulrich, 2011).

Las células madre endimarias, epSPC , agrupadas en neurosféricas, inician una salida paulatina del conglomerado cuando están en cultivo, y se distribuyen por toda la placa, que es lo que les permite diferenciarse, mientras están en cultivo en suspensión no comienzan la diferenciación. Es llamativa la presencia de las subunidades del receptor ionotrópico, P2X6,

en el núcleo celular, marcando estructuras repetitivas. Es la primera vez que se describe esta presencia y que se relaciona con la maduración de la célula, ya que la subunidad P2X6 que es trasladada al núcleo modifica la actividad del procesamiento de los mensajeros interactuando con el factor asociado al espliceosoma SF-3A1. En el apartado dedicado a los diferentes receptores, hemos dedicado unos párrafos a la presencia y relevancia del receptor P2X6 en el núcleo celular, en relación con los cuerpos de Cajal. En estas células madre de la medula endimaria, (epSPC) y por lo tanto inmaduras tenemos un cuadro perfecto de la abundante presencia de cuerpos de Cajal (Díaz-Hernández et al., 2015) (figura 6).

Recientemente, nuestro grupo demostró que las células madre progenitoras endimarias, epSPC, expresan receptores para nucleótidos, siendo los más abundantes los ionotrópicos P2X4 y P2X7, ambos funcionales y los metabotrópicos P2Y1 y P2Y4, que responden respectivamente a ADP agonista completo del primero, y al ATP, UTP el segundo. Comparando estas células epSPC obtenidas de animales sanos y los de lesión espinal, se observa una regulación negativa del P2Y1 y un incremento de la expresión en el P2Y4 (Gomez-Villafuertes et al., 2015). El trasplante de las neuroesferas no diferenciadas a las ratas con lesión medular, se puede correlacionar con una recuperación de la función motora (Gomez-Vil-



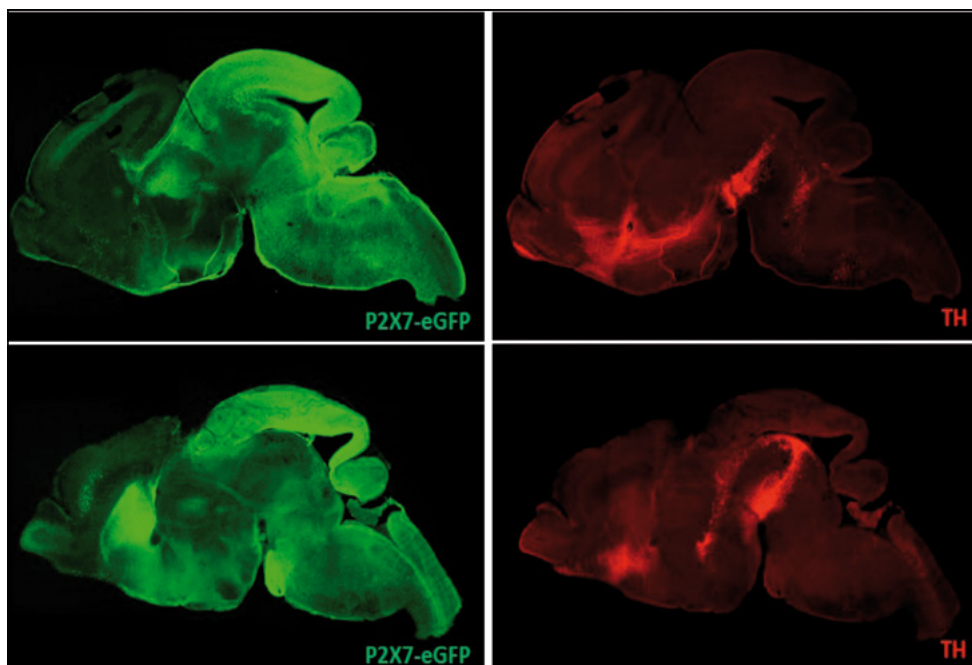
**Figura 6.** Reparación de la medula espinal. Células madre endimarias. Neuroesferas. Paneles laterales. Neuroesferas de células madre endimarias en cultivo en flotación, abajo cuando las neuroesferas se adhieren a un disco de cultivo, e inician su diferenciación y migración. Panel de la derecha. En microscopia confocal se observa la presencia del receptor P2X6 en el núcleo muy distribuido en corpúsculos localizados en la heterocromatina, la cromatina activa, pero no en la cromatina condensada.



lafuertes et al., 2015). En una reciente publicación en el *Journal of Visualized Experiments*, hemos conseguido imágenes in vivo de una única célula bajo cámara que permite seguir su trayectoria durante incluso semanas, esta técnica conocida como *time-lapse video-microscopy*, permite en alta resolución abordar cuestiones esenciales respecto a la biología y los linajes derivados de una única célula y su naturaleza, ello permitirá conocer muchos de los aspectos derivados de la formación de células madre en diversas condiciones, como es el caso en la lesión de médula espinal (Gomez-Villafuertes et al. 2017).

#### 4.5 El modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP mapas cerebrales del desarrollo temprano

En el apartado 4.2 hemos presentado sucintamente al factor transcripcional Sp1 que controla la expresión del receptor P2X7. Entre los receptores nucleares relevantes, el factor Sp1 (specificity protein 1) se une directamente con alta afinidad a las secuencias del DNA ricas en Guanina-Citosina, GC, que están localizadas en la región proximal del el sitio de inicio de la transcripción. Funciona, además, como una proteína armazón o plataforma a la que se pueden unir y reclutar otros factores transcripcionales relevantes. Destacar que el factor transcripcional Sp1 fue el primero descubierto, siendo el investigador Robert Tjian quien en 1983 publico en la revista *Cell* un trabajo pionero titulado: *Isolation of transcription*



**Figura 7.** Corte seriado sagital de un ratón recién nacido. Panel izquierdo, corte del ratón P2rx7-EGFP, fluorescente. Panel derecho: inmunohistoquímica con anticuerpos anti tiro-sina hidroxilasa, marcador de las vías cerebrales de dopamina y noradrenalina. Véase las notables diferencias donde generalmente las zonas más intensas no colocalizan.

*factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II.* (Dyran and Tjian 1983). Este fue el pistoletazo de partida para comprender como se genera la heterogeneidad celular y el papel esencial que juegan los factores transcripcionales que dirigen a la RNA polimerasa II. El conocimiento en profundidad de los factores transcripcionales específicos para la RNA polimerasa II en la etapa embrionaria es lo que permitió a Yamanaka inducir las células del adulto a células pluripotentes, iPSC. El trabajo fue publicado en la revista Cell en 2006 con el título: *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* (Takahashi and Yamanaka, 2006).

El ratón transgénico, P2rx7-EGFP, ha sido y es un poderoso aliado para conocer la importancia del P2X7 en el desarrollo cerebral y la total correlación con el factor de transcripción Sp1. Este ratón transgénico ha sido un excelente modelo para comprender la evolución del P2X7 durante el periodo fetal y postnatal hasta maduración total (García-Huerta et al., 2012; Gómez-Villafuertes et al., 2015).

El promotor del receptor murino del P2X7 contiene al menos cuatro sitios de unión para el factor Sp1, que están muy conservados en todos los mamíferos estudiados hasta el momento. En el modelo del ratón transgénico, P2rx7-EGFP, se expresa la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor del P2rx7. Esto significa que vamos a conocer en qué lugares y como se expresa el P2X7 neural endógeno del ratón, pero al mismo tiempo la proteína verde fluorescente que será controlada por los mismos factores transcripcionales. Una vez hechos los controles, el ratón P2rx7-EGFP es una herramienta valiosísima para seguir sus pasos en el desarrollo sin necesidad de realizar detecciones mediante inmunohistoquímicas, ya que el propio tejido es fluorescente, podemos así ver directamente en cortes sagitales del cerebro de ratón la secuencia de planos de sus lugares de expresión. Al mismo tiempo si sobre estos cortes hacemos una tinción con anticuerpos fluorescentes de la Tirosina hidroxilasa, el enzima que transforma el aminoácido tirosina en el de L-DOPA, metabolito a partir del cual se forman la dopamina, noradrenalina y adrenalina, Podremos comparar la expresión de receptor P2X7 con las vías aminérgicas, específicamente, las dopaminérgicas y noradrenérgicas cerebrales (figura 7).

## 5. NEUROGENESIS, SEÑALIZACIÓN PURINERGICA Y DESARROLLO DE PROGENITORES

Los nuevos descubrimientos en ciencia son difíciles de aceptar y generalmente son tratados con escepticismo, hasta que la evidencia experimental desborda y no queda más remedio que cohabitar con ellos. Pasan después una fase en que todo se basa en la posibilidad de regenerar todo el sistema, es el caso de la neurogénesis del adulto, para después sosegar y empezar a analizar con calma hasta donde llega su bondad.

Comprender como se forman los progenitores neurogliales implica conocer cómo se desarrolla el sistema nervioso de los vertebrados, sobre todo de los mamíferos y que factores transcripcionales se activan en cada etapa, hasta llegar al individuo adulto. Teniendo en cuenta que una vez en la etapa adulta existen nichos neurogénicos que permanecen todavía activos y capaces de proliferar y diferenciarse, la cuestión es si los factores que lo impulsan son los mismos requeridos para el cerebro en desarrollo.

### 5.1. Factores que intervienen en la generación del sistema nervioso

El sistema nervioso de los vertebrados se desarrolla a partir del ectodermo, que es la capa más externa del embrión. Una vez que se forma la placa neural, se invagina formando un canalículo y posteriormente se cierra formando el tubo neural.

Las células del ectodermo quedan tapizando el interior del tubo, y se van a diferenciar en el eje rostro-caudal para dar lugar a todas las estructuras cerebrales, con sus células específicas. Para construir el neocortex de los mamíferos es necesario una gran batería de factores intrínsecos, de los cuales veremos sus características en los párrafos siguientes (Job and Tan 2003). En nuestro país, contamos con un gran anatomista, el profesor y catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, el Dr. Luis Puellas, quien ha estudiado la distribución de los genes marcadores Hox y otros. Ha sido gracias a su tenacidad que conocemos con precisión como se forma el cerebro en el embrión, su evolución durante la etapa fetal y como alcanza la funcionalidad al nacimiento y tiempo en el entorno (Puellas and Rubenstein, 1993; 2003; Rubenstein et al. 1994).

El desarrollo de las estructuras embrionarias del tubo neural requiere de la expresión de genes específicos y un programa epigenético de cada tiempo y lugar que controlan además los factores de transcripción conocidos como la familia de los homeoboxes (Liu et al. 2015). En la zona rostral, donde estará el futuro cerebro, expresan el factor de transcripción Otx2, mientras que, en la parte caudal, donde estará la medula espinal, es el factor de transcripción Gbx2 el que se expresa. Estos factores de transcripción controlan de modo opuesto el factor Wnt y su cascada de señalización que son de los más activos en la regulación de la diferenciación de los progenitores neurales corticales (Munji et al. 2011). La zona donde se expresa Otx2, produce entre otras las neuronas dopaminérgicas, mientras que la zona caudal que expresa Gbx2 induce la aparición de las neuronas serotoninérgicas. Cada una de las zonas bajo la influencia de un determinado homeobox, tiene asociadas diferentes enfermedades (Beby and Lamonerie 2013).

La posición rostrocaudal es uno de los factores determinantes para la especialización de los subtipos de neuronas, cada uno dependiendo de los niveles de los factores de transcripción Hox y que se corresponden con los homeodominios. La formación de un sistema nervioso segmentado se corresponde con las zonas de expresión de estos genes. La segmentación del desarrollo del cuerpo y del sistema nervioso se descubrió en los insectos en la década de los 80 del pasado siglo, y hoy día sabemos que es generalizable a todos los animales, por supuesto incluyendo a los mamíferos, de los que los humanos formamos parte. El genoma de los mamíferos contiene 39 Hox genes, todos ellos derivados de un antepasado común.

La regulación de la migración neural y sus posibles anomalías comienzan a coger relevancia en los casos de autismo, considerándose como un grupo de enfermedades con un alto grado de heredabilidad, aunque difíciles de estudiar y definir, ya que dependen del momento y el lugar en que los factores transcripcionales responsables de la anomalía comienzan su actividad (Reiner et al. 2016).

Entre los muchos factores de transcripción que son esenciales para definir el patrón rostrocaudal del córtex se encuentra el Pax6. Magdalena Götz descubrió, junto con su grupo, que la expresión de Pax6 es capaz de impedir o restringir la migración de células neurales entre el córtex y los ganglios basales en la etapa de desarrollo (Götz et al. 1998; 2003; 2015-a; 2015-b). No obstante, hay un artículo que para nosotros tiene especial significado, ya que este discurso está orientado hacia las células de glía. El descubrimiento que fue crucial y muy temprano, 1998, es el primero que hace referencia al descubrimiento de que el gen Pax6 controla la diferenciación de la glía radial en el córtex cerebral (Götz et al. 1988).

Con la glía radial estamos entrando en la respuesta a ¿cómo se realiza físicamente la organización del cerebro? y ¿cómo unas células neurogliales en origen van a producir toda la diversidad de neuronas y glía?, ya que ambas tienen un origen común.

## **5.2. La glía radial y migración de las células neurogliales.**

Durante el desarrollo, la capa externa de la corteza del sistema nervioso central, está tapizada por células bipolares, que se comportan como células progenitoras y son capaces de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Estas células evolucionan emitiendo prolongaciones hacia el interior y formando células bipolares, que constituyen el andamiaje que permite la migración de otras células hacia el interior de las estructuras cerebrales, es lo que conocemos como glía radial. Tanto en ratón como en humanos, se caracterizan fácilmente en inmunohistoquímica con el anticuerpo fluorescente específico para la proteína fibrilar ácida de glía, la GFAP. Los marcadores de la glía radial que la sitúan a medio camino entre glía y neuronas, y la tecnología por “cell sorting” permitió separar los linajes de los progenitores neurales. Identificando además del Pax6, los factores de transcripción Neurogenina y Reelina, este último implicado en la maduración de la glía radial en el desarrollo cerebral (Götz, 2003).

Durante la evolución de los mamíferos, las regiones cerebrales se adaptaron de modo dinámico mediante crecimiento selectivo y expansión que ha resultado específico de cada especie. Un ejemplo muy llamativo es el del neocórtex humano, con giros profundos y circunvoluciones que han permitido aumentar, en gran medida, el número de neuronas corticales en prácticamente todas las áreas cerebrales. La forma del cerebro humano es el resultado de una etapa de formación de giros que comienza a mitad de la gestación. Antes del sexto mes de desarrollo fetal la superficie cerebral es lisa. Los primeros surcos, aparecen durante el sexto mes y se alargan y ramifican hasta formar el patrón de giros y surcos que tenemos al nacer, aunque después del nacimiento todavía se forman algunos más. Estos plegamientos o circunvoluciones y giros implican un incremento de la extensión de la superficie externa, el córtex, y el modo más conveniente de plegarla para que se adapte a la forma craneal. Esa expansión tangencial del córtex ha recibido mucha atención, tanto desde el punto de vista de la física, como de la neurobiología y han planteado numerosas preguntas (Tallinen et al. 2016).

### **5.3. Neurogénesis en el adulto: En que especies, donde y en qué circunstancias**

Hay una frase que Ramón y Cajal dejó escrita, pero que los que hemos venido detrás la hemos utilizado a veces, sin acabar de leer todo el texto:

*Pero la especialización funcional del cerebro impone a las neuronas dos grandes lagunas: la incapacidad proliferativa y la diferenciación intraprotoplásmica irreversible. Esa es la razón por la cual, una vez finalizado el desarrollo del sistema nervioso, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los centros adultos las vías nerviosas están ya fijas, acabadas e inmutables. Cualquiera de ellas puede morir, ninguna puede ser regenerada.”*

Entre las virtudes de Cajal estaba predecir el futuro e imaginar posibles tecnologías no disponibles en su tiempo, además pensaba que aparecerían científicos tan geniales como él, que podrían dar la vuelta a casi cualquier situación en los sistemas biológicos. Y unos párrafos más adelante escribe:

*“Será para la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este duro decreto. Inspirado con grandes ideales, se debe de trabajar para impedir o moderar el decaimiento gradual de las neuronas, para salvar la casi invencible rigidez de sus conexiones y para restablecer los caminos normales de los nervios, cuando la enfermedad ha cercenado los centros que estaban íntimamente asociados”*

Ramón y Cajal (1913). *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso.*

La primera publicación que hacía referencia a la existencia de neurogénesis en los animales adultos proviene del grupo de Altman y se remonta a 1965. Tiene por título: *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats* (Altman and Das 1965). La demostración se basó en inyectar timidina- $H^3$  a ratas jóvenes

y realizar estudios mediante autoradiogramas de la presencia de zonas marcadas radiactivamente en los cortes de cerebro. En las ratas jóvenes aparecía un intenso marcaje en las capas endimial y subendimial en los ventrículos laterales y el tercer ventrículo. La intensidad del marcaje radioactivo desaparecía con rapidez, mientras que en el giro dentado del hipocampo se mantenía durante más tiempo y coincidía con el incremento en las células granulares.

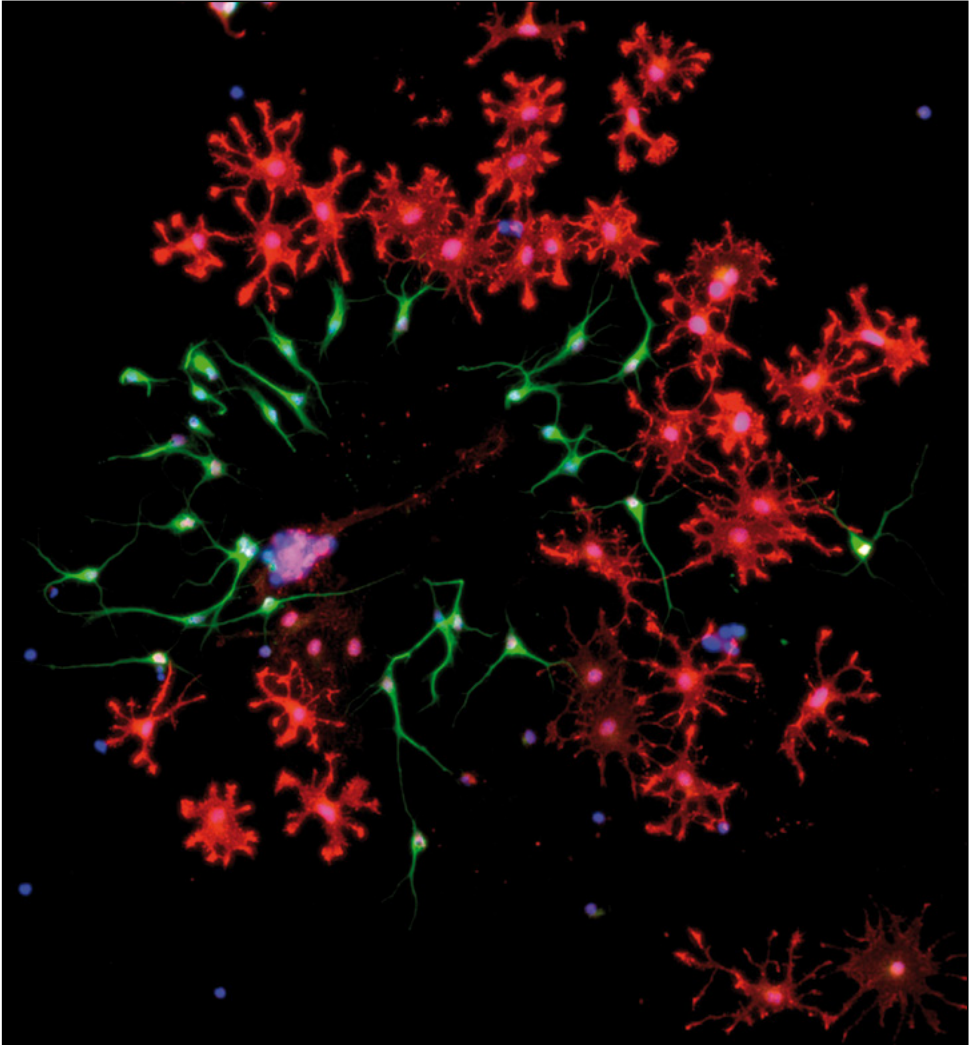
El dogma dominante de la inamovilidad del Sistema Nervioso Central, relegó al ostracismo el trabajo de Altman, que permaneció ignorado hasta su rescate por Alvarez-Buylla, quien demostró, sin ningún género de dudas, la neurogénesis en el adulto. Los primeros trabajos fueron hechos en pájaros cantores, más concretamente en pinzones y canarios. Identifica a la zona ventricular del cerebro de las aves, como el lugar donde se producía la proliferación y migración que seguía un patrón de diferenciación radial. Posteriormente demostró similar proliferación y migración en los mamíferos (Alvarez-Buylla and Nottebohm 1988; Alvarez-Buylla et al 1990) (Alvarez-Buylla and Kirn 1997).

Es importante resaltar que, Alvarez-Buylla, desde las primeras publicaciones, describe los nichos neurogénicos del adulto con capacidad para generar neuronas y glía, así como la capacidad de migrar desde la zona de proliferación y diferenciación, zona subventricular, hasta el bulbo olfativo, en el caso del ratón y la rata. Por el camino, se van diferenciando y hay dos tipos de células especiales, los neuroblastos y una especie de células gliales que los van protegiendo durante la migración, hasta que alcanzan su localización definitiva en el bulbo olfativo, pero no parecen estar guiados por ninguna de las vías descritas en el cerebro en desarrollo, ya que no intervienen, ni la glía radial, ni los haces de axones. El estudio de los factores que pueden inducir la formación de linajes gliales y neurales, en el cerebro adulto, así como la capacidad de revertirlos, ha ocupado a grandes investigadores estos últimos años. Las células madre neurales del adulto, NSCs, se parecen más a las células gliales, como los astrocitos maduros o las células endimarias del cerebro adulto, mientras que las células madre neurales embrionarias se parecen más a las células de la glía radial Götz et al. 2015a). No obstante algunos factores de transcripción y su regulación son comunes a la etapa embrionaria y adulta en la diferenciación. Es el caso de los factores Pax6, Gsx2 y Dlx. No obstante, en ambos casos existen diferencias notables en sus mecanismos de actuación a nivel molecular (Lopez-Juarez et al. 2013).

Los factores externos, extrínsecos, que señalizan a través de receptores de membrana, también presentan analogías y diferencias en la neurogénesis fetal y la neurogénesis del adulto, citar solamente el efecto de la señalización por Wnt que se mantiene muy similar en ambos casos, mientras que la proteína morfogénica de hueso, BMP, se mantiene apagada y sin efecto en el cerebro adulto. Otros muchos factores de crecimiento tienen incidencias variables sobre la diferenciación de las células neurales progenitoras, ya sea en cerebro en desarrollo o en adulto (Götz et al. 2015b).

Existe otra peculiaridad diferencial entre la neurogénesis en el cerebro en desarrollo y la del adulto, que no es otra que la propia actividad funcional del cerebro maduro con un gran

número de neurotransmisores. Entre los neurotransmisores destacan el GABA y glutamato, que ejercen un papel relevante, ya que existen interneuronas GABAérgicas que liberan el neurotransmisor en el entorno de los nichos neurogénicos de la Zona subventricular, SVZ. Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos ejercen igualmente un papel relevante en la proliferación celular de los progenitores neurales en el embrión y la ablación o *Knock down* del subtipo mGluR5 es uno de los más característicos, reduciendo significativamente el número de neuronas (figura 8).

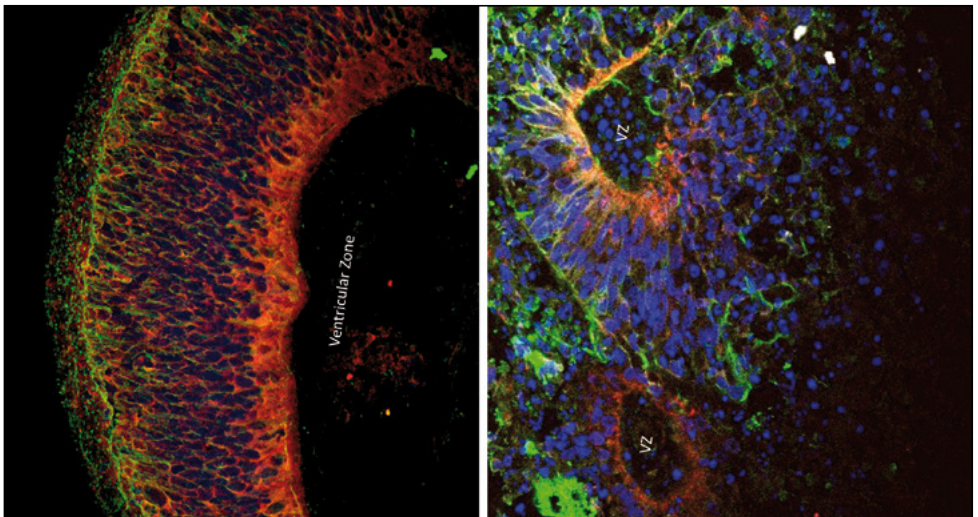


**Figura 8.** Células madre de la zona subventricular SVZ, después de inducir la diferenciación en neurogénesis del adulto. En este caso las vías de señalización estimuladas producen un gran número de oligodendrocitos marcados en rojo, neuronas en verde y muy pocos astrocitos.

### 5.3-a Receptores de nucleótidos y su efecto en la neurogénesis del adulto

Otro grupo de neurotransmisores relevantes, y menos conocidos, son los de nucleótidos, los denominados receptores purinérgicos, con dos familias, los P2X ionotrópicos y los P2Y metabotrópicos, cada una de ellas con sus respectivos subtipos. En trabajos recientes de nuestro grupo en la Universidad Complutense de Madrid, hemos constatado que están presentes en los nichos neurogénicos del giro dentado del hipocampo en las terminales de los axones dándoles direccionalidad y participando en procesos de reparación en el cerebro adulto (Diaz-Hernandez et al. 2012; Gomez-Villafuertes et al. 2015; Miras-Portugal et al. 2015; 2016).

Con las nuevas tecnologías de transfección, para sobre expresar, bloquear o marcar con proteínas fluorescentes los diferentes genes en células progenitoras, o en animales genéticamente modificados, se puede seguir con una cierta exactitud el devenir de las células madre de los nichos neurogénicos y sus progenies.. El Dr. Felipe Ortega ha puesto a punto la técnica de transfección de células madre de la zona subventricular, que junto con la técnica de visualización de los cambios en tiempo real, mediante video imagen (*time lapse*), han permitido conocer con mucha más precisión los receptores P2 implicados en la diferenciación en cerebro adulto mediados por nucleótidos. Donde los receptores de ADP y el de UTP,son muy relevantes entre los receptores metabotrópicos; siendo el P2X7 el más importante entre los ionotrópicos. Tanto en los progenitores y su progénia de la zona subventricular (SVZ), como en el modelo de los progenitores originarios de la subpendimal (SEZ). Para ello contaba con la experiencia adquirida con otros factores transcripcionales,



**Figura 9.** La tecnología de los minibrains organoides cerebrales ha permitido generar, a partir de una célula, estructuras muy similares al córtex cerebral, que sirven para estudiar cómo se organizan y generan esas estructuras y que suceden anomalías cuando la célula es portadora de mutaciones debidas a cambios genéticos. En este caso han servido para demostrar que muchos receptores P2X y P2Y participan en la formación de estas estructuras de modo secuencial y se distribuyen como en la formación temprana del córtex.



internos o extrínsecos, donde ha demostrado que de las células madre neurogénicas del adulto, el factor Prox1, es necesario para la diferenciación a oligodendrocitos (Bunk et al. 2016; Ortega et al. 2013a, 2013b).

Especial interés tiene el efecto del transportador vesicular de Nucleótidos, VNUT , sobre la diferenciación y maduración neuronal ya que, por un lado hemos podido demostrar su participación activa en la diferenciación y neuritogénesis en células de neuroblastoma murino (Menendez-Mendez et al., 2015), y este transportador vesicular de nucleótidos co-localiza con la población de progenitores neuronales durante el cerebelo en desarrollo.

Otra técnica de gran relevancia es la de producción de organoides, basados en progenitores embrionarios, o en linajes humanos de células transfectadas para convertirlas en pluripotentes inducidas iPSC, siguiendo la técnica de Shinya Yamanaka, reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012 se puede conocer con bastante exactitud como proceden y actúan en la formación del sistema nervioso. Con esta técnica hemos visto que los receptores de nucleótidos, sobre todo el P2X7, es un elemento dinamizador en la organización de organoides cerebrales (manuscrito en preparación).

## REFLEXIONES FINALES

La señalización purinérgica mediada por los nucleótidos, es la más reciente en el estudio de su función, tanto a nivel celular como de órganos y sistemas, por supuesto esto también explica que sea la última en llegar al área de la farmacología. Son los únicos agentes extracelulares cuyos receptores han sido clonados para demostrar su existencia y carentes de la farmacología previa de señalización, que tanto ha ayudado a los sistemas previamente conocidos en la neurotransmisión. Tampoco disponíamos de agonistas o antagonistas, presentes en la naturaleza, que fueran o utilizados en medicina desde antiguo, como el Cannabis, o el Opio; o extraordinariamente tóxicos, como la Nicotina, el Kainato, que permitieron identificar a los receptores ionotrópicos de acetilcolina y glutamato, respectivamente.

Todavía seguimos buscando agonistas de los diferentes subtipos que actúen *in vivo*, y nos permitan establecer cuáles son sus cometidos fisiológicos y su papel real en la fisiopatología. Aunque ya disponemos de modelos de animales transgénicos que nos permiten aproximarnos a disfunciones conocidas. Existen no obstante excepciones, el receptor P2Y<sub>12</sub> dispone de una farmacología potentísima por su efecto preventivo del ictus. Pero incluso en este caso el compuesto, clopidogrel, denominado Plavix comercialmente, era ya un fármaco huérfano utilizado como antitrombótico, aunque no se sabía, como actuaba, ni siquiera que era un pro-fármaco que necesitaba ser metabolizado en el hígado para formar el compuesto activo. Todo ello previo a ser clonado el receptor P2Y<sub>12</sub>. El P2Y<sub>13</sub> es un excepcional receptor, que nos protege del estrés oxidativo y genotóxico, aunque carecemos de farmacología. Aquí hemos dejado constancia de la relevancia del receptor P2X<sub>7</sub> en el sistema nervioso central donde participa en todo tipo de tareas, tanto en neuronas como en astrocitos. Su promotor asociado a un reportero fluorescente permite ver la importancia en el desarrollo y las vías que siguen los axones y su implicación en todas las enfermedades que causan con inflamación. Curiosamente es un receptor que se une prácticamente a todos los colorantes, que son sus antagonistas.

Ahora somos conscientes de que los procesos de neurogénesis en el cerebro en desarrollo y en el adulto mantienen aspectos comunes, pero divergen en los estímulos y factores que necesitan para el proceso, ya que su función es esencialmente diferente: Formar de *novo*, o reparar en lo posible.

Tanto en el sistema nervioso en formación como en el adulto la neurogénesis se produce con un origen glial: La glía radial siendo esencial en la embriogénesis y las células progenitoras de los epitelios tapizantes de los ventrículos SEZ en los adultos. En las lesiones del cerebro adulto, o situaciones de hipoxia, la recuperación implica una fase de inflamación caracterizada por la astrogliosis, que consiste en la proliferación de los astrocitos reactivos.

Las células embrionarias NEC dan origen a todos los tipos de glía y neuronas. Las células SEZ del adulto dan lugar a todos los tipos de células neurales, excepto a la glía radial y los astrocitos reactivos pueden dar lugar a todo tipo de células neurales excepto a la glía radial. Esto es algo diferente a lo anteriormente aceptado, pues tendríamos una fuente

inagotable de células madre en los astrocitos que son cinco veces más en número que las neuronas (Kleiderman et al. 2016).

Las neuronas y la glía forman un tándem en perfecta armonía y no existirá función neural ni neurotransmisión sin su complicidad.

Ya no estamos limitados en la materia prima de las células madre progenitoras neurales embrionarias para reparar el cerebro. Analizando en profundidad el gran número y diversidad de células gliales que tenemos en nuestro cerebro adulto, solo nos queda comprender como utilizar todo su potencial.

Estos últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los factores que pueden inducir la formación de linajes gliales y neurales, en el cerebro adulto, así como la capacidad de revertirlos. Las células madre neurales del adulto, NSCs, se parecen más a las células gliales, como los astrocitos maduros o las células endoteliales del cerebro adulto, mientras que las células madre neurales embrionarias se parecen más a las células de la glía radial (Götz et al. 2015a).

Una peculiaridad diferencial entre la neurogénesis en el cerebro en desarrollo y la del adulto, se debe a la propia actividad funcional del cerebro maduro con un gran número de neurotransmisores. Numerosos estudios han demostrado que los neurotransmisores tienen efectos sobre la diferenciación de las células. La neurotransmisión GABAérgica ejerce un papel relevante, ya que existen interneuronas GABAérgicas que liberan el neurotransmisor en el entorno de los nichos neurogénicos de la Zona subventricular, SVZ. La neurotransmisión glutamatérgica y su efecto sobre los progenitores es más confusa por el gran número de receptores con efectos opuestos. Es un tema de interés para estudiar en el futuro (Götz et al. 2015a).

En lo que a nuestro grupo se refiere, un grupo muy relevante de neurotransmisores y menos conocidos, son los nucleótidos, con las familias, P2X ionotrópicos y los P2Y metabotrópicos, cada una de ellas con sus respectivos subtipos. En trabajos recientes de nuestro grupo en la Universidad Complutense de Madrid, hemos constatado que están presentes en los nichos neurogénicos del giro dentado del hipocampo en las terminales de los axones dándoles direccionalidad y participando en procesos de reparación en el cerebro adulto (Díaz-Hernández et al. 2012; Gómez-Villafuertes et al. 2015; Miras-Portugal et al. 2015; 2016).

El Dr. Felipe Ortega en su reciente incorporación al grupo de investigación purinérgico de la UCM, ha puesto a punto la técnica de transfección de células madre de la zona subventricular, que junto con la técnica de visualización de los cambios en tiempo real, mediante video imagen (*time lapse*), han permitido conocer con mucha más precisión los receptores P2 implicados en la diferenciación en cerebro adulto mediados por nucleótidos (Ortega et al. 2013a, 2013b). En diciembre de 2017, en el Journal of Visual Experiments hemos publicado el primer trabajo donde se ve bajo monitorización continua y posterior

seguimiento de células aisladas, la progresión de los linajes de múltiples poblaciones neurales, en donde se aprecia el efecto de diversos agonistas y antagonistas de los receptores fundamentalmente metabotrópicos P2Y (Gomez-Villafuertes et al. 2017).

En estos últimos meses hemos comenzado el estudio de la presencia de progenitores neurales en el cerebelo. La principal razón es que es la zona cerebral en la que tenemos una mayor experiencia y que además tiene un desarrollo más tardío. La presencia de células en el adulto con marcadores de células madre, que también siguen expresando el transportador de nucleótidos vesicular, VNUT, de modo funcional sirvió de acicate para comenzar los estudios. Podemos confirmar la presencia de células madre con capacidad proliferativa y de diferenciación, con el VNUT jugando un importante papel y que a nuestro parecer debe de ser considerado como el primer elemento de la neurotransmisión purinérgica (manuscrito en preparación).

## BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ-BUYLLA A, AND NOTTEBOHM F (1988). *Migration of young neurons in the adult avian brain*. Nature, 335, 353-354.

ALVAREZ-BUYLLA A, THEELEN M, AND NOTTEBOHM F, (1990). *Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell división*. Neuron, 5: 101-109.

ALVAREZ-BUYLLA A AND KIRN JR (1997). *Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds*. J. Neurobiol 33: 585-601.

ALTMAN S. (2000). *Protocells and RNA Self-Replication. The road to RNase P*. Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):827-8. PMID: 11017184.

ALVES M, GOMEZ-VILLAFUERTE R, DELANTY N, FARRELL MA, O'BRIEN DF, MIRAS-POR-TUGAL MT, HERNANDEZ MD, HENSHALL DC, ENGEL T. (2017) *Expression and function of the metabotropic purinergic P2Y receptor family in experimental seizure models and patients with drug-refractory epilepsy*. Epilepsia. 2017 Sep;58(9):1603-1614. doi: 10.1111/epi.13850. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733972

ANNE C, GASNIER B. (2014) *Vesicular neurotransmitter transporters: mechanistic aspects*. Curr Top Membr. 2014;73:149-74. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00003-7. Review. PMID: 24745982

ARAVANTINOY-FATOROU K, ORTEGA F, CHRONI-TZARTOU D, ANTONIOU N, POULOPOU-LOU C, POLITIS PK, BERNINGER B, MATSAS R, THOMAIDOU D. (2015). *CEND1 and NEUROGENIN2 Reprogram Mouse Astrocytes and Embryonic Fibroblasts to Induced Neural Precursors and Differentiated Neurons*. Stem Cell Reports. 2015 Sep 8;5(3):405-18. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.012. Epub 2015 Aug 28. PMID:26321141.

ARRIBAS-BLÁZQUEZ M, OLIVOS-ORÉ LA, BARAHONA MV, SÁNCHEZ DE LA MUELA M, SOLAR V, JIMÉNEZ E, GUALIX J, MCINTOSH JM, FERRER-MONTIEL A, MIRAS-PORTUGAL MT, ARTALEJO AR. (2018). *Overexpression of P2X3 and P2X7 Receptors and TRPV1 Channels in Adrenomedullary Chromaffin Cells in a Rat Model of Neuropathic Pain*. Int J Mol Sci. 2019 Jan 3;20(1). pii: E155. doi: 10.3390/ijms20010155. PMID: 30609840.

BAQI Y, MÜLLER CE. (2018) *Antithrombotic P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists: recent developments in drug discovery*. Drug Discov Today. 2018 Oct 3. pii: S1359-6446(18)30224-1. doi: 10.1016/j.drudis.2018.09.021. [Epub ahead of print] Review. PMID: 30291899.

BARNARD EA, BURNSTOCK G, WEBB TE. (1994). *G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family*. Trends Pharmacol Sci. 1994 Mar;15(3):67-70. Review. PMID: 8184488

BEAMER EH, JURADO-ARJONA J, JIMENEZ-MATEOS EM, MORGAN J, RESCHKE CR, KENNY A, DE LEO G, OLIVOS-ORÉ LA, ARRIBAS-BLÁZQUEZ M, MADDEN SF, MERCHÁN-RUBIRA J, DELANTY N, FARRELL MA, O'BRIEN DE, AVILA J, DIAZ-HERNANDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT, ARTALEJO AR, HERNANDEZ F, HENSHALL DC, ENGEL T. (2018). *MicroRNA-22 Controls Aberrant Neurogenesis and Changes in Neuronal Morphology After Status Epilepticus*. Front Mol Neurosci. 2018 Dec 11;11:442. doi: 10.3389/fnmol.2018.00442. eCollection 2018. PMID:30618601.

BEBY F, LAMONERIE T. (2013). *The homeobox gene Otx2 in development and disease*. Exp Eye Res. 111:9-16. doi: 10.1016/j.exer.2013.03.007. Review. PMID: 23523800.

BICKER F, VASIC V, HORTA G, ORTEGA F, NOLTE H, KAVYANIFAR A, KELLER S, STANKOVIC ND, HARTEK PN, BENEDITO R, LUTZ B, BÄUERLE T, HARTWIG J, BAUMGART J, KRÜGER M, RADYUSHKIN K, ALBERI L, BERNINGER B, SCHMIDT MHH.(2017). *Neurovascular EGFL7 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone and thereby affects olfactory perception*. Nat Commun. 2017 Jun 28;8:15922. doi: 10.1038/ncomms15922.PMID:28656980.

BRADKE, F AND DOTTI, C. G. (1999). *The role of local actin instability in axon formation*. Science 283, 1931-1934.

BUNK EC, ERTAYLAN G, ORTEGA F, PAVLOU MA, GONZALEZ CANO L, STERGIPOULOS A, SAFAIYAN S, VÖLS S, VAN CANN M, POLITIS PK, SIMONS M, BERNINGER B, DEL SOL A, SCHWAMBORN JC. (2016). *Prox1 Is Required for Oligodendrocyte Cell Identity in Adult Neural Stem Cells of the Subventricular Zone*. Stem Cells. 2016 Aug;34(8):2115-29. doi: 10.1002/stem.2374. Epub 2016 Apr 21.PMID: 27068685.

BURNSTOCK G. (2006). *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. Trends in pharmacological sciences, 2006 - Elsevier.

— (2007) *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiological reviews, 2007 - Am Physiological Soc.

— (2006) *Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling*. Pharmacological reviews, 2006 - ASPET.

— (2008). *Purinergic signalling and disorders of the central nervous system*. Nature reviews Drug discovery, 2008 - nature.com.

— (2015). *Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system*. (2015). Curr Med Chem. 2015;22(7):819-44. Review. PMID:25005189.

— (2016). *Purinergic mechanisms and pain. Purinergic signalling: therapeutic developments*. (2016). Adv Pharmacol. 2016;75:91-137. doi: 10.1016/bs.apha.2015.09.001. Epub 2015 Nov 4. Review.PMID:26920010.

- (2017). *The therapeutic potential of purinergic signalling*. *Biochem Pharmacol*. 2017 Jul 21. pii: S0006-2952(17)30504-X. doi: 10.1016/j.bcp.2017.07.016. MID:28735873.
- (2017). *Purinergic Signalling: Therapeutic Developments*. *Front Pharmacol*. 2017 Sep 25;8:661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661. eCollection 2017. Review.PMID:28993732.
- BURNSTOCK G, KENNEDY C. (1985). *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* *Gen Pharmacol*. 1985;16(5):433-40. Review.PMID:2996968.
- BURNSTOCK G., ULRICH, H., (2011). *Purinergic signaling in embryonic and stem cell development*. *Cell Mol. Life Sci*. 68, 1369e1394. 92.
- BURNSTOCK G., VERKHRATSKY A. (2009). *Evolutionary origins of the purinergic signalling system*. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Apr; 195(4):415-47. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x. Epub 2009 Feb 12. Review.
- BURNSTOCK G, VERKHRATSKY A. (2010). *Vas deferens—a model used to establish sympathetic cotransmission*. *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Mar;31(3):131-9. doi: 10.1016/j.tips.2009.12.002. Epub 2010 Jan 13. Review. PMID: 20074819.
- CECH TR. Nobel lecture. *Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena*. *Biosci Rep*. 1990 Jun;10(3):239-61. Review.PMID:1699616.
- CECH TR., STEITZ JA., ATKINS JF. Editores (2019)-Cold Spring Harb Perspect Biol doi: 10.1101/cshperspect.a032417.
- CHUNG J, WANG X, MARUYAMA T, MA Y, ZHANG X, MEZ J, SHERVA R, TAKEYAMA H; ALZHEIMER'S DISEASE NEUROIMAGING INITIATIVE, LUNETTA KL, FARRER LA, JUN GR. (2017) *Genome-wide association study of Alzheimer's disease endophenotypes at prediagnosis stages*. *Alzheimers Dement*. 2017 Dec 20. pii: S1552-5260(17)33842-6. doi: 10.1016/j.jalz.2017.11.006. [Epub ahead of print] PMID:29274321.
- COLAMARINO SA, TESSIER-LAVIGNE M. (1995a). *The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons*. *Cell*. 1995 May 19;81(4):621-9.PMID: 7758116.
- (1995b) *The role of the floor plate in axon guidance*. *Annu Rev Neurosci*. 1995;18:497-529. Review.PMID:7605072.
- CUNHA R. A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J. Neurochem*. 139 1019–1055. 10.1111/jnc.13724.
- DEL PUERTO A, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, TAPIA M, GOMEZ-VILLAFUERTE R, BENITEZ MJ, ZHANG J, MIRAS-PORTUGAL MT, WANDOSELL F, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, GARRIDO JJ. *Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on*

- axonal elongation*. J Cell Sci. 2012 Jan 1;125(Pt 1):176-88. doi: 10.1242/jcs.091736. Epub 2012 Jan 16. PMID: 22250198
- DEL PUERTO A, FRONZAROLI-MOLINIERES L, PEREZ-ALVAREZ MJ, GIRAUD P, CARLIER E, WANDOSELL F, DEBANNE D, GARRIDO JJ. (2015). *ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury*. Cereb Cortex. 2015 Aug;25(8):2282-94. doi: 10.1093/cercor/bhu035. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24610121.
- DA SILVA, J. S. AND DOTTI, C. G. (2002). *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis*. Nat. Rev. Neurosci. 3, 694-704.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ M, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2000). *Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP*. Br J Pharmacol. 2000 May;130(2):434-40. PMID:10807683.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ M, GÓMEZ-VILLAFUERTES R, HERNANDO F, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2001). *Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits*. Neurosci Lett. 2001 Apr 6;301(3):159-62. PMID:11257422
- Díaz-Hernández, M, PINTOR J, CASTRO E, MIRAS-PORTUGAL MT. (2002). *Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals*. Neuropharmacology. 2002 Jan;42(1):20-33. PMID: 11750913.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ M, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2004). *Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals*. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Dec;311(3):954-67. Epub 2004 Jul 13. PMID: 15254146
- DÍAZ-HERNÁNDEZ M, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2006). *Role of CaC-MKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals*. J Mol Neurosci. 2006;30(1-2):17780. PMID:17192670
- DÍAZ-HERNANDEZ M, DEL PUERTO A, DÍAZ-HERNANDEZ JI, DIEZ-ZAERA M, LUCAS JJ, GARRIDO JJ, MIRAS-PORTUGAL MT. (2008). *Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons*. J Cell Sci. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3717-28. doi: 10.1242/jcs.034082. PMID: 18987356
- DÍAZ-HERNÁNDEZ M, DÍEZ-ZAERA M, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, GÓMEZ-VILLAFUERTES R, CANALS JM, ALBERCH J, MIRAS-PORTUGAL MT, LUCAS JJ. (2009). *Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration*. FASEB J. 2009 Jun;23(6):1893-906. doi: 10.1096/fj.08-122275. Epub 2009 Jan 26. PMID: 19171786



DÍAZ-HERNÁNDEZ M, GÓMEZ-RAMOS A, RUBIO A, GÓMEZ-VILLAFUERTES R, NARANJO JR, MIRAS-PORTUGAL MT, AVILA J. (2010). *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau*. J Biol Chem. 2010 Oct 15;285(42):32539-48. doi: 0.1074/jbc.M110.145003. Epub 2010 Jul 15. PMID: 20634292

DIAZ-HERNANDEZ JI, GOMEZ-VILLAFUERTES R, LEÓN-OTEGUI M, HONTECILLAS-PRieto L, DEL PUERTO A, TREJO JL, LUCAS JJ, GARRIDO JJ, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT, DIAZ-HERNANDEZ M. (2012). *In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 $\beta$  and secretases*. Neurobiol Aging. 2012 Aug;33(8):1816-28. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040. Epub 2011 Nov 1. PMID:22048123.

DIAZ-HERNANDEZ M, HERNANDEZ F, MIRAS-PORTUGAL MT, AVILA J. (2015). *TNAP Plays a Key Role in Neural Differentiation as well as in Neurodegenerative Disorders*. Subcell Biochem. 2015;76:375-85. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_18. Review. PMID: 26219721.

DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, SEBASTIÁN-SERRANO Á, GÓMEZ-VILLAFUERTES R, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT. (2015). *Age-related nuclear translocation of P2X6 subunit modifies splicing activity interacting with splicing factor 3A1*. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0123121. doi: 10.1371/journal.pone.0123121. eCollection 2015. PMID: 25874565.

DÍEZ-ZAERA M, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ E, ZIMMERMANN H, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT. (2011). *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons*. Mol Biol Cell. 2011 Apr;22(7):1014-24. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0740. Epub 2011 Feb 2. PMID:21289095.

ENGEL T, GOMEZ-VILLAFUERTES R, TANAKA K, MESURET G, SANZ-RODRIGUEZ A, GARCIA-HUERTA P, MIRAS-PORTUGAL MT, HENSHALL DC, DIAZ-HERNANDEZ M. (2012). *Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice*. FASEB J. 2012 Apr;26(4):1616-28. doi: 10.1096/fj.11-196089. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22198387.

ERTEKIN-TANER N. (2017). *Identifying therapeutic targets for Alzheimer's disease with big data*. Neurodegener Dis Manag. 2017 Apr;7(2):101-105. doi: 10.2217/nmt-2017-0008. Epub 2017 May 22. PMID:28540771.

ERICKSON JD, EIDEN LE. (1993). *Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter*. J Neurochem. 1993 Dec;61(6):2314-7. PMID: 8245983

FARRUKH A, ORTEGA F, FAN W, MARICHAL N, PAEZ JI, BERNINGER B, CAMPO AD, SALIERNO MJ. (2017). *Bifunctional Hydrogels Containing the Laminin Motif IKVAV Promote Neurogenesis*. Stem Cell Reports. 2017 Nov 14;9(5):1432-1440. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.002. Epub 2017 Oct 5. PMID:28988991.

FIDEU, MD; ARCE, A; ESQUIFINO, AI; MIRAS-PORTUGAL, MT (1994). *Thyroid hormones modulate both adenosine transport and adenosine A-1 receptors in rat brain*. American Journal of Physiology: V267 pp C1651-C1656 : 1994.

FISCHER, E. (1881). *Über das Ca<sub>2+</sub>*. Ber deut chem Ges 14, 637–644.

— (1907). *Untersuchungen in der Puringruppe*. Springer, Berlin.

FISKE, C. H. & SUBBAROW, R. Y. (1929). *Phosphorous compounds of muscle and liver*. Science 70, 381–382.

FONSECA B, MARTÍNEZ-ÁGUILA A, PÉREZ DE LARA MJ, MIRAS-PORTUGAL MT, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PINTOR J. (2017). *Changes in P2Y Purinergic Receptor Expression in the Ciliary Body in a Murine Model of Glaucoma*. Front Pharmacol. 2017 Oct 10;8:719. doi: 10.3389/fphar.2017.00719. eCollection 2017. PMID: 29085298

FOUNTAIN SJ AND BURNSTOCK G. (2009). *An evolutionary history of P2X receptors. Purinergic Signal*. 2009 Sep; 5(3): 269–272. Published online 2008 Nov 18. doi: 10.1007/s11302-008-9127-x .PMCID: PMC2717308. PMID: 19015952

FOUNTAIN SJ, (2013). *Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology*. Front Cell Neurosci. 2013 Dec 6;7:247. doi: 10.3389/fncel.2013.00247. PMID:24367292 PMCID: PMC3853471 DOI:10.3389/fncel.2013.00247.

FREDHOLM, B. B. (2003) *Caffeine and the biological role of adenosine receptors*. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia , 69:4, 18-36.

FUMAGALLI M, LECCA D, COPPOLINO GT, PARRAVICINI C, ABBRACCHIO MP. (2017). *Pharmacological Properties and Biological Functions of the GPR17 Receptor, a Potential Target for Neuro-Regenerative Medicine*. Adv Exp Med Biol. 2017;1051:169-192. doi: 10.1007/5584\_2017\_92.PMID: 28828731

FUXE K, DAHLSTRÖM AB, JONSSON G, MARCELLINO D, GUESCINI M, DAM M, MANGER P, AGNATI L. (2010). *The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain*. Prog Neurobiol. 2010 Feb 9;90(2):82-100. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.10.012. Epub 2009 Oct 21. Review.PMID:19853007.

GALL JG. (2000). *Cajal bodies: the first 100 years*. Ann Rev Cell Dev Biol 2000; 16:273-300; PMID:11031238; <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.273>

— (2003). *The centennial of the Cajal body*. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4:975-80; PMID:14685175; <https://doi.org/10.1038/nrm1262>

GARCÍA-GONZÁLEZ D, MURCIA-BELMONTE V, ESTEBAN PF, ORTEGA F, DÍAZ D, SÁN-

CHEZ-VERA I, LEBRÓN-GALÁN R, ESCOBAR-CASTAÑONDO L, MARTÍNEZ-MILLÁN L, WERUAGA E, GARCÍA-VERDUGO JM, BERNINGER B, DE CASTRO F. (2016). *Anosmin-1 over-expression increases adult neurogenesis in the subventricular zone and neuroblast migration to the olfactory bulb*. Brain Struct Funct. 2016 Dec;221(9):4741. PMID:27600917.

GARCÍA-HUERTA P, DÍAZ-HERNANDEZ M, DELICADO EG, PIMENTEL-SANTILLANA M, MIRAS-PORTUGAL MT, GÓMEZ-VILLAFUERTE R. (2012). *The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system*. J Biol Chem. 2012 Dec 28;287(53):44628-44. doi: 10.1074/jbc.M112.390971. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23139414

GARRIDO JJ, SIMÓN D, VAREA O, WANDOSELL F. (2007). *GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation*. FEBS Lett. 2007 Apr 17;581(8):1579-86. Epub 2007 Mar 19. PMID:17391670

GASCÓN S, MURENU E, MASSERDOTTI G, ORTEGA F, RUSSO GL, PETRIK D, DESHPANDE A, HEINRICH C, KAROW M, ROBERTSON SP, SCHROEDER T, BECKERS J, IRMLER M, BERNDT C, ANGELI JP, CONRAD M, BERNINGER B, GÖTZ M. (2016). *Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming*. Cell Stem Cell. 2016 Mar 3;18(3):396-409. doi: 10.1016/j.stem.2015.12.003. Epub 2015 Dec 31. PMID:26748418.

GASCÓN S, ORTEGA F, GÖTZ M. (2017). *Transient CREB-mediated transcription is key in direct neuronal reprogramming*. Neurogenesis (Austin). 2017 Feb 6;4(1):e1285383. doi: 10.1080/23262133.2017.1285383. eCollection 2017. PMID:28321434.

GIRALDEZ L, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PINTOR J, CASTRO E, MIRAS-PORTUGAL MT. (2001). *Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce  $[Ca^{2+}]_i$  increase in rat basal ganglia aminergic terminals*. J Neurosci Res. 2001 Apr 15;64(2):174-82. PMID: 11288145.

GÓMEZ-RAMOS A, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, RUBIO A, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, MIRAS-PORTUGAL MT, AVILA J. (2009). *Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein*. Eur Neuropsychopharmacol. 2009 Oct;19(10):708-17. doi: 10.1016/j.euroneuro.2009.04.006. Epub 2009 May 7. PMID:19423301

GÓMEZ-RAMOS A, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, RUBIO A, MIRAS-PORTUGAL MT, AVILA J. (2008) *Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells*. Mol Cell Neurosci. 2008 Apr;37(4):673-81. doi: 10.1016/j.mcn.2007.12.010. Epub 2007 Dec 15. PMID:18272392

GÓMEZ-VILLAFUERTE R, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2001). *Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion*. J Neurochem. 2001 Apr;77(1):84-93. PMID: 11279264

- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PINTOR J, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT. (2003). *GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes*. *Neuropharmacology*. 2003 Mar;44(3):311-23. PMID:12604091
- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, DEL PUERTO A, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, BUSTILLO D, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, HUERTA PG, ARTALEJO AR, GARRIDO JJ, MIRAS-PORTUGAL MT. (2009). *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells*. *FEBS J*. 2009 Sep;276(18):5307-25. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07228.x. Epub 2009 Aug 13. PMID: 19682070
- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT, GUALIX J. (2014). *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation*. *J Neurochem*. 2014 Nov;131(3):290-302. doi: 10.1111/jnc.12794. Epub 2014 Jul 10. PMID:24947519
- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ FJ, ALASTRUE-AGUDO A, STOJKOVIC M, MIRAS-PORTUGAL MT, MORENO-MANZANO V. (2015). *Purinergic Receptors in Spinal Cord-Derived Ependymal Stem/Progenitor Cells and Their Potential Role in Cell-Based Therapy for Spinal Cord Injury*. *Cell Transplant*. 2015; 24(8):1493-509. doi: 10.3727/096368914X682828. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25198194.
- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, GARCÍA-HUERTA P, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, MIRAS-PORTUGAL MT. (2015). *PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions*. *Sci Rep*. 2015 Dec 21;5:18417. doi: 10.1038/srep18417. PMID: 26687764.
- GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PANIAGUA-HERRANZ L, GASCON S, DE AGUSTÍN-DURÁN D, FERRERAS MO, GIL-REDONDO JC, QUEIPO MJ, MENENDEZ-MENDEZ A, PÉREZ-SEN R, DELICADO EG, GUALIX J, COSTA MR, SCHROEDER T, MIRAS-PORTUGAL MT, ORTEGA F. (2017). *Live Imaging Followed by Single Cell Tracking to Monitor Cell Biology and the Lineage Progression of Multiple Neural Populations*. *J Vis Exp*. 2017 Dec 16;(130). doi: 10.3791/56291. PMID: 29286427.
- GÖTZ M. (2003). *Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells*. *Neuroscientist*. 9(5):379-97. Review. PMID: 14580122.
- GÖTZ M., STOYKOVA A. AND GRUSS P. (1998). *Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex*. *Neuron* 21, 1031-1044.
- GÖTZ M., NAKAFUKU M. AND PETRIK D. (2015a). *Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences*. *CSH Perspectives*, 1-23.
- GÖTZ M., SIRKO S., BECKERS J. AND IRMLER M. (2015b). *Reactive Astrocytes as neural stem or progenitor cells – in vivo lineage, in vitro potential, and genome-wide expression analysis*. *Glia* 63,1452–1468.

- GROSSMAN, S.D., ROSENBERG, L.J., WRATHALL, J.R., 2001. *Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion*. Exp. Neurol. 168,273e282.
- GUALIX J, ABAL M, PINTOR J, GARCIA-CARMONA F, MIRAS-PORTUGAL MT. (1996). *Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation*. J Biol Chem. 1996 Jan 26;271(4):1957-65. PMID:8567644
- GUALIX J, FIDEU MD, PINTOR J, ROTLLÁN P, GARCÍA-CARMONA F, MIRAS-PORTUGAL MT. (1997). *Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla*. FASEB J. 1997 Oct;11(12):981-90. PMID:9337151
- GUALIX J, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (1999a). *Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles*. J Neurochem. 1999 Sep;73(3):1098-104. PMID:10461900
- GUALIX J, ALVAREZ AM, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (1999b). *Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent epsilon-ATP and granular size increase induced by ATP*. Receptors Channels. 1999;6(6):449-61.
- GUALIX J, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT.(2003). *Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain*. J Neurochem. 2003 Oct;87(1):160-71. PMID: 12969263
- GUALIX J, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, PINTOR J, LLANSOLA M, FELIPO V, MIRAS-PORTUGAL MT. (2014). *Presence of diadenosine polyphosphates in microdialysis samples from rat cerebellum in vivo: effect of mild hyperammonemia on their receptors*. Purinergic Signal. 2014;10(2):349-56. doi: 10.1007/s11302-013-9382-3. Epub 2013 Aug 13. PMID:23943472
- GUTIÉRREZ-MARTÍN Y, BUSTILLO D, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, TORREGROSA-HETLAND C, BINZ T, GUTIÉRREZ LM, MIRAS-PORTUGAL MT, ARTALEJO AR. (2011). *P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells*. J Biol Chem. 2011 Apr 1;286(13):11370-81. doi: 10.1074/jbc.M110.139410. Epub 2011 Feb 3. PMID:21292765
- HARDEN TK, BOYER JL, NICHOLAS RA (1995). *P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35:541–579
- HATTORI M, GOUAUX E. (2012). *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors*. Nature. 2012 May 10;485(7397):207-12. doi: 10.1038/nature11010. PMID: 22535247
- HIASA M, TOGAWA N, MORIYAMA Y. (2014). *Vesicular nucleotide transport: a brief history and the vesicular nucleotide transporter as a target for drug development*. Curr Pharm Des. 2014;20(16):2745-9. Review. PMID:23886392.

HOLLOPETER G, JANTZEN HM, VINCENT D, LI G, ENGLAND L, RAMAKRISHNAN V, YANG RB, NURDEN P, NURDEN A, JULIUS D, CONLEY PB. (2001). *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature. 2001 Jan 11;409(6817):202-7. PMID:11196645.

HOYLE CH, POSTORINO A, BURNSTOCK G. (1995). *Pre- and postjunctional effects of diadenosine polyphosphates in the guinea-pig vas deferens*. J Pharm Pharmacol. 1995 Nov;47(11):926-31. PMID: 8708987 .

HOYLE CH, PINTOR J, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT. (1997). *Antagonism of P2X receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate*. Eur J Pharmacol. 1997 Aug 27;333(2-3):R1-2. PMID:9314047.

JIMENEZ-MATEOS EM, ARRIBAS-BLAZQUEZ M, SANZ-RODRIGUEZ A, CONCANNON C, OLIVOS-ORE LA, RESCHKE CR, MOONEY CM, MOONEY C, LUGARA E, MORGAN J, LANGA E, JIMENEZ-PACHECO A, SILVA LF, MESURET G, BOISON D, MIRAS-PORTUGAL MT, LETAVIC M, ARTALEJO AR, BHATTACHARYA A, DIAZ-HERNANDEZ M, HENSHALL DC, ENGEL T. (2015). *microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus*. Sci Rep. 2015 Dec 3;5:17486. doi: 10.1038/srep17486. PMID: 26631939.

JIMENEZ-PACHECO A, MESURET G, SANZ-RODRIGUEZ A, TANAKA K, MOONEY C, CONROY R, MIRAS-PORTUGAL MT, DIAZ-HERNANDEZ M, HENSHALL DC, ENGEL T. (2013). *Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079*. Epilepsia. 2013 Sep;54(9):1551-61. doi: 10.1111/epi.12257. Epub 2013 Jun 28. PMID:23808395.

JIMENEZ-PACHECO A, DIAZ-HERNANDEZ M, ARRIBAS-BLÁZQUEZ M, SANZ-RODRIGUEZ A, OLIVOS-ORÉ LA, ARTALEJO AR, ALVES M, LETAVIC M, MIRAS-PORTUGAL MT, CONROY RM, DELANTY N, FARRELL MA, O'BRIEN DF, BHATTACHARYA A, ENGEL T, HENSHALL DC. (2016). *Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy*. J Neurosci. 2016 Jun 1;36(22):5920-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4009-15.2016. PMID: 27251615.

JOYCE GF, SZOSTAK JW. (2018). *Protocells and RNA Self-Replication*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Sep 4;10(9). pii: a034801. doi: 10.1101/cshperspect.a034801. Review. PMID: 30181195.

KASTING JF & SIEFERT JL. (2002). *Life and the evolution of Earth's atmosphere*. Science 296: 1066-1068. Review.

KATO Y, HIASA M, ICHIKAWA R, HASUZAWA N, KADOWAKI A, IWATSUKI K, SHIMA K, ENDO Y, KITAHARA Y, INOUE T, NOMURA M, OMOTE H, MORIYAMA Y, MIYAJI T. (2017). *Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and in-*

- flammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 18. pii: 201704847. doi: 10.1073/pnas.1704847114. [Epub ahead of print]PMID:28720702.
- KING BF, LIU M, PINTOR J, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT, BURNSTOCK G. (1999). *Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors*. Br J Pharmacol. 1999 Nov; 128(5):981-8. PMID: 10556935.
- KLEIDERMAN S, GUTBIER S, UGUR TUFEKCI K, ORTEGA F, SÁ JV, TEIXEIRA AP, BRITO C, GLAAB E, BERNINGER B, ALVES PM, LEIST M. (2016). *Conversion of Nonproliferating Astrocytes into Neurogenic Neural Stem Cells: Control by FGF2 and Interferon- $\gamma$* . Stem Cells. 2016 Dec;34(12):2861-2874. doi: 10.1002/stem.2483. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27603577.
- KLISHIN A, LOZOVAYA N, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT, KRISHTAL O. (1994). *Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus*. Neuroscience. 1994 Jan;58(2):235-6. PMID: 8152536.
- LEÓN D, HERVÁS C, MIRAS-PORTUGAL MT. (2006). *P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons*. Eur J Neurosci. 2006 Jun;23(11):2999-3013.PMID:16819989
- LEÓN D, MARÍN-GARCÍA P, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, DE LA O FO, GARCÍA-CARMONA F, MIRAS-PORTUGAL MT. (2007-a). *P2X agonist BzATP interferes with amplex-red-coupled fluorescence assays*. Anal Biochem. 2007 Aug 1;367(1):140-2. Epub 2007 PMID:17562321
- LEÓN D, SÁNCHEZ-NOGUEIRO J, MARÍN-GARCÍA P, MIRAS-PORTUGAL MA. (2007-b). *Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons*. Neurochem Int. 2008 May;52(6):1148-59. doi: 10.1016/j.neu-int.2007.12.004. Epub 2007 Dec 15.PMID:18242779.
- LEÓN-OTEGUI M, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT, GUALIX J. (2011). *Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on  $\alpha$ -secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells*. FEBS Lett. 2011 Jul 21;585(14):2255-62. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.048. Epub 2011 Jun 2.PMID: 21651910.
- LIPMAN, F. 1941. *Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy*. Adv Enzymol 1, 99–162.
- LIU Y, MA D, JI C. (2015). *Zinc fingers and homeoboxes family in human diseases*. Cancer Gene Ther. 22(5):223-6. doi: 10.1038/cgt.2015.16. Review.PMID:25857360.
- LOHMANN, K. ( 1929). *Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel*. Naturwissenschaften 17, 624–625.

LUSTIG KD, SHIAU AK, BRAKE AJ, JULIUS D. (1993). *Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 1;90(11):5113-7. PMID: 7685114.

MAIDA Y, MASUTOMI K. (2015). *Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase*. Cancer Sci 2015; 106:1486-92; PMID:26331588; <https://doi.org/10.1111/cas.12806>.

MATEO J, MIRAS-PORTUGAL MT, ROTLLÁN P. (1997a). *Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells*. Am J Physiol. 1997 Sep;273(3 Pt 1):C918-27. PMID: 9316413

MATEO J, ROTLLAN P, MARTI E, GOMEZ DE ARANDA I, SOLSONA C, MIRAS-PORTUGAL MT. (1997b). *Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of Torpedo electric organ*. Biochem J. 1997 May 1;323 ( Pt 3):677-84. PMID: 9169600

MATEO J, ROTLLÁN P, MIRAS-PORTUGAL MT. (1996). *Suramin--a powerful inhibitor of neural ecto-diadenosine polyphosphate hydrolase*. Br J Pharmacol. 1996 Sep;119(1):1-2. PMID: 8872348.

MENÉNDEZ-MÉNDEZ A, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, ORTEGA F, GUALIX J, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, MIRAS-PORTUGAL MT. (2017). *Specific Temporal Distribution and Subcellular Localization of a Functional Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Cerebellar Granule Neurons*. Front Pharmacol. 2017 Dec 22;8:951. doi: 10.3389/fphar.2017.00951. eCollection 2017. PMID: 29311945.

MILLER SL. (1953). *A production of amino acids under possible primitive earth conditions*. Science. 1953 May 15;117(3046):528-9. PMID: 13056598

MIRAS-PORTUGAL MT, CASTRO E, MATEO J, PINTOR J. (1996). *The diadenosine polyphosphate receptors: P2D purinoceptors*. Ciba Found Symp. 1996; 198:35-47; discussion 48-52. PMID: 8879817.

MIRAS-PORTUGAL MT, DIAZ-HERNANDEZ JI, GOMEZ-VILLAFUERTE R, DIAZ-HERNANDEZ M, ARTALEJO AR, GUALIX J. (2015). *Role of P2X7 and P2Y2 receptors on  $\alpha$ -secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation "in vivo" by P2X7 receptor*. 2015. Computational and structural biotechnology journal 13, 176-181

MIRAS-PORTUGAL MT, GOMEZ-VILLAFUERTE R, GUALIX J, DIAZ-HERNANDEZ JI, ARTALEJO AR, ORTEGA F, DELICADO EG, PEREZ-SEN R. (2016). *Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection*. Neuropharmacology. 2016 May;104:243-54. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.002. Epub 2015 Sep 8. Review. PMID: 26359530

MIRAS-PORTUGAL MT, SEBASTIÁN-SERRANO Á, DE DIEGO GARCÍA L, DÍAZ-HERNÁNDEZ



- M. (2017). *Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology*. J Neurosci. 2017 Jul 26;37(30):7063-7072. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017. Review. PMID: 28747389
- MIRAS-PORTUGAL MT, QUEIPO MJ, GIL-REDONDO JC, ORTEGA F, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, GUALIX J, DELICADO EG, PÉREZ-SEN R. (2018). *P2 receptor interaction and signalling cascades in neuroprotection*. Brain Res Bull. 2018 Dec 26. pii: S0361-9230(18)30724-X. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.12.012. [Epub ahead of print] Review. PMID: 30593879.
- MORENTE V, PÉREZ-SEN R, ORTEGA F, HUERTA-CEPAS J, DELICADO EG, MIRAS-PORTUGAL MT. (2014). *Neuroprotection elicited by P2Y13 receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery*. Biochim Biophys Acta. 2014 Sep;1843(9):1886-98. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.004. Epub 2014 May 20. PMID: 24851838
- MORENO-MANZANO, V., RODRIGUEZ-JIMENEZ, F.J., GARCIA-ROSELLO, M., LAINEZ, S., ERCEG, S., CALVO, M.T., RONAGHI, M., LLORET, M., PLANELLS-CASES, R., SANCHEZ-PUELLES, J.M., STOJKOVIC, M., 2009. *Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function*. Stem Cells 27, 733e743.
- MORIYAMA Y, NOMURA M. (2018). *Clodronate: A Vesicular ATP Release Blocker*. Trends Pharmacol Sci. 2018 Jan;39(1):13-23. doi: 10.1016/j.tips.2017.10.007. Epub 2017 Nov 13. Review. PMID:29146440
- MOTHE, A.J., TATOR, C.H., (2013). *Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury*. Int. J. Dev. Neurosci. 31, 701e713.
- MUNJI RN, CHOE Y, LI G, SIEGENTHALER JA, PLEASURE SJ. (2011). *Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors*. J Neurosci., 31(5):1676-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5404-10. PMID: 21289176.
- NAMBA T, MOCHIZUKI H, ONODERA M, MIZUNO Y, NAMIKI H, SEKI T. (2005) *The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus*. Eur J Neurosci. 22(8):1928-41. PMID: 16262632.
- NAVARRETE M. AND ARAQUE A. (2014). *The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking*. Frontiers in neuroanatomy 8, 33-66.
- NEDERGAARD M. (1994). *Direct signalling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells*. Science, 263(5154): 1768-71.
- NEDERGAARD M. AND VERKHRATSKY A. (2012). *Artifact versus reality- How astrocytes contribute to synaptic events*. Glia 60, 1013-1023.

ORTEGA F, PÉREZ-SEN R, DELICADO EG, MIRAS-PORTUGAL MT. (2009). *P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons*. Neurotox Res. 2009 Apr;15(3):193-204. doi: 10.1007/s12640-009-9020-6. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19384592.

ORTEGA F, PÉREZ-SEN R, MORENTE V, DELICADO EG, MIRAS-PORTUGAL MT. (2010). *P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons*. Cell Mol Life Sci. 2010 May;67(10):1723-33. doi: 10.1007/s00018-010-0278-x. Epub 2010 Feb 10. PMID: 20146080.

ORTEGA F, BERNINGER B, COSTA MR. (2013). *Primary culture and live imaging of adult neural stem cells and their progeny*. Methods Mol Biol. 1052:1-11. doi: 10.1007/7651\_2013\_22. PMID: 23640252.

ORTEGA F, GASCÓN S, MASSERDOTTI G, DESHPANDE A, SIMON C, FISCHER J, DIMOU L, CHICHUNG LIE D, SCHROEDER T, BERNINGER B. (2013). *Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling*. Nat Cell Biol.;15(6):602-13. doi: 10.1038/ncb2736. PMID: 23644466

ORTEGA F, COSTA MR. (2016). *Live Imaging of Adult Neural Stem Cells in Rodents*. Front Neurosci. 2016 Mar 7;10:78. doi: 10.3389/fnins.2016.00078. eCollection 2016. Review. PMID: 27013941.

PANIAGUA-HERRANZ L, GIL-REDONDO JC, QUEIPO MJ, GONZÁLEZ-RAMOS S, BOSCA L, PÉREZ-SEN R, MIRAS-PORTUGAL MT, DELICADO EG. (2017). *Prostaglandin E<sub>2</sub> Impairs P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> Receptor Signaling in Cerebellar Astrocytes via EP3 Receptors*. Front Pharmacol. 2017 Dec 22;8:937. doi: 10.3389/fphar.2017.00937. eCollection 2017. PMID: 29311938

PENA E, BERCIANO MT, FERNANDEZ R, OJEDA JL, LAFARGA M. (2001). *Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons*. J Comp Neurol 2001; 430:250-63; PMID:11135260; <https://doi.org/10.1002/1096>

PÉREZ DE LARA MJ, GUZMÁN-ARÁNGUEZ A, DE LA VILLA P, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, MIRAS-PORTUGAL MT, PINTOR J. (2015). *Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology*. Mol Vis. 2015 Sep 2;21:1060-70. eCollection 2015. PMID:26392744.

PÉREZ DE LARA MJ, GUZMÁN-ARANGUEZ A, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT, PINTOR J. (2018). *Increased Ap<sub>4</sub>A levels and ecto-nucleotidase activity in glaucomatous mice retina*. Purinergic Signal. 2018 Sep;14(3):259-270. doi: 10.1007/s11302-018-9612-9. Epub 2018 Jun 8. PMID: 29948577

PÉREZ-SEN R, GÓMEZ-VILLAFUERTE R, ORTEGA F, GUALIX J, DELICADO EG, MIRAS-PORTUGAL MT. (2017). *An Update on P2Y<sub>13</sub> Receptor Signalling and Function*. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1051:139-168. doi: 10.1007/5584\_2017\_91. Review. PMID: 28815513.

PINTOR J, DÍAZ-REY MA, TORRES M, MIRAS-PORTUGAL MT. (1992a). *Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca<sup>2+</sup> dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine*. *Neurosci Lett*. 1992 Mar 2;136(2):141-4. PMID:1641181.

PINTOR J, KOWALEWSKI HJ, TORRES M, MIRAS-PORTUGAL MT, ZIMMERMANN H, (1992b). *Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the torpedo electric organ*. *Neuroscience Research Communications*: V10: 1- pp 9-15 (1992).

PINTOR J, ROTLLÁN P, TORRES M, MIRAS-PORTUGAL MT. (1992c). *Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release*. *Anal Biochem*. 1992 Feb 1;200(2):296-300. PMID:1632493.

PINTOR J, DÍAZ-REY MA, MIRAS-PORTUGAL MT. (1993). *Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals*. *Br J Pharmacol*. 1993; 108(4):1094-9. PMID: 8485620.

PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT. (1995-a). *A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes*. *Br J Pharmacol*. 1995. Jul;115(6):895-902. PMID:7582517

— (1995-b). *P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system*. *Gen Pharmacol*. 1995 Mar;26(2):229-35. Review. PMID: 7590071

PINTOR J, PORRAS A, MORA F, MIRAS-PORTUGAL MT. (1995). *Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat*. *J Neurochem*. 1995 Feb;64(2):670-6. PMID: 7830059

PINTOR J, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT. (1997a). *Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor*. *Mol Pharmacol*. 1997 Feb;51(2):277-84. PMID: 9203633.

PINTOR J, PUCHE JA, GUALIX J, HOYLE CH, MIRAS-PORTUGAL MT. (1997b). *Diadenosine polyphosphates evoke Ca<sup>2+</sup> transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP*. *J Physiol*. 1997 Oct 15;504 ( Pt 2):327-35. PMID: 9365907.

PUELLES L, AND RUBENSTEIN JL. (1993). *Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization*. *Trends Neurosci*. 16: 472-479.

PUELLES L, AND RUBENSTEIN JL. (2003). *Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model*. Trends Neurosci. 26: 469-76.

DEL PUERTO A, DÍAZ-HERNÁNDEZ JI, TAPIA M, GOMEZ-VILLAFUERTE R, BENITEZ MJ, ZHANG J, MIRAS-PORTUGAL MT, WANDOSELL F, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, GARRIDO JJ. (2012). *Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation*. J Cell Sci. 2012 Jan 1;125(Pt 1):176-88. doi: 10.1242/jcs.091736. Epub 2012 Jan 16. PMID:22250198.

QUEIPO MJ, GIL-REDONDO JC, MORENTE V, ORTEGA F, MIRAS-PORTUGAL MT, DELICADO EG, PÉREZ-SEN R. (2018). *P2X7 Nucleotide and EGF Receptors Exert Dual Modulation of the Dual-Specificity Phosphatase 6 (MKP-3) in Granule Neurons and Astrocytes, Contributing to Negative Feedback on ERK Signaling*. Front Mol Neurosci. 2018 Jan 10;10:448. doi: 10.3389/fnmol.2017.00448. eCollection 2017. PMID:29375309.

RAMÓN Y CAJAL, S., 1890b. *Notas anatómicas. I. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria*. Gac. Sanit. Barc. 12, 413–419.

— 1890c. *A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet*. Anat. Anz. 5, 609–613.

— (1897). *Algo sobre la significación fisiológica de la neuroglia*. Revista Trimestral Micrografía 1, 3–47.

— (1899). *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Tomo I: Imprenta y Librería de Nicolás Moya. (Publicado en su primera edición en francés)

— (1903). *Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados e invertebrados*. Trab Lab Inv Biol Univ Madr 1903; 2:129-221.

— (1906). *The Structure and Connexions of Neurons*. Nobel Lectures Nobelprize.Org.

— (1913-a) *Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nervioso del hombre y animales*. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid 11, 219-237.

— (1913-b). *Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano*. Trab.Lab. Invest. Biol. XI, 225–315.

— (1913-c). *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso*.

REINER O, KARZBRUN E, KSHIRSAGAR A, KAIBUCHI K. (2013). *Regulation of neuronal migration, an emerging topic in autism spectrum disorders*. J Neurochem. 136(3):440-56. doi: 10.1111/jnc.13403. Review. PMID: 26485324.

RODRIGUES RJ, ALMEIDA T, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MARQUES JM, FRANCO R, SOLSONA C, MIRAS-PORTUGAL MT, CIRUELA F, CUNHA RA. (2016). *Presynaptic P2X1-3 and  $\alpha$ 3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus*. Neuropharmacology. 2016 Jun;105:241-257. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.022. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26801076

RODRIGUEZ DEL CASTILLO A, TORRES M, DELICADO EG, MIRAS-PORTUGAL MT. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. J Neurochem. 1988 Dec;51(6):1696-703. PMID: 2846780.

ROGHANI A, SHIRZADI A, BUTCHER LL, AND EDWARDS RH, (1998). *Distribution of the vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system*. Neuroscience. Vol.82,nº 4 pp1195-1212, 1998.

ROY R, NICCOLINI F, PAGANO G, POLITIS M. (2016). *Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016 Jul;43(7):1376-86. doi: 10.1007/s00259-016-3349-x. Epub 2016 Mar 16. Review. PMID: 26984612.

RUBENSTEIN JLR; MARTINEZ S, SHIMAMURA K, AND PUELLES L. (1994). *The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model*. Science, 266: 578-580.

SAWYER IA, STURGILL D, SUNG MH, HAGER GL, DUNDR M. (2016). *Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity*. Bioessays. 2016 Dec;38(12):1197-1208. doi: 10.1002/bies.201600144. Epub 2016 Oct 21. Review PMID: 27767214

SAWYER IA, HAGER GL, DUNDR M. (2017). *Specific genomic cues regulate Cajal body assembly*. RNA Biol. 2017 Jun 3;14(6):791-803. doi: 10.1080/15476286.2016.1243648. Epub 2016 Oct 7. Review. PMID:27715441

SCHÜTZ B, SCHÄFER MK, EIDEN LE, WEIHE E. (1998). *Vesicular amine transporter expression and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut*. Brain Res Dev Brain Res. 1998 Mar 12;106(1-2):181-204.

SEBASTIÁN-SERRANO Á, DE DIEGO-GARCÍA L, MARTÍNEZ-FRAILES C, ÁVILA J, ZIMMERMANN H, MILLÁN JL, MIRAS-PORTUGAL MT, DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2014). *Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Regulates Purinergic Transmission in the Central Nervous System During Development and Disease*. Comput Struct Biotechnol J. 2014 Dec 15;13:95-100. doi: 10.1016/j.csbj.2014.12.004. eCollection 2015. Review.PMID:25709758.

SEBASTIÁN-SERRANO Á, ENGEL T, DE DIEGO-GARCÍA L, OLIVOS-ORÉ LA, ARRIBAS-BLÁZQUEZ M, MARTÍNEZ-FRAILES C, PÉREZ-DÍAZ C, MILLÁN JL, ARTALEJO AR, MIRAS-PORTUGAL MT, HENSHALL DC, DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2016). *Neurodevelopmental alterations and seizures developed by mouse model of infantile hypophosphatasia are associated with*

- purinergic signalling deregulation*. Hum Mol Genet. 2016 Oct 1;25(19):4143-4156. doi: 10.1093/hmg/ddw248. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27466191.
- SEBASTIÁN-SERRANO Á, ENGEL T, DE DIEGO-GARCÍA L, OLIVOS-ORÉ LA, ARRIBAS-BLÁZQUEZ M, MARTÍNEZ-FRAILES C, PÉREZ-DÍAZ C, MILLÁN JL, ARTALEJO AR, MIRAS-PORTUGAL MT, HENSHALL DC, DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2016). *Neurodevelopmental alterations and seizures developed by mouse model of infantile hypophosphatasia are associated with purinergic signalling deregulation*. Hum Mol Genet. 2016 Oct 1;25(19):4143-4156. doi: 10.1093/hmg/ddw248. Epub 2016 Jul 27. PMID:27466191.
- SEN, R. P., DELICADO, E. G., ALVAREZ, A., BROCKLEBANK, A. M., WILEY, J. S., AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (1998). *Flow cytometric studies of nucleoside transport regulation in single chromaffin cells*. FEBS Lett. 422, 368–372. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00047-7.
- SHI, S. H., CHENG, T., JAN, L. Y. AND JAN, Y. N. (2004). *APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity*. Curr.Biol. 14, 2025-2032.
- STERN JL, ZYNER KG, PICKETT HA, COHEN SB, BRYAN TM. (2012). *Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently*. Mol Cell Biol. 2012 Jul;32(13):2384-95. doi: 10.1128/MCB.00379-12. Epub 2012 Apr 30.
- SZOSTAK J. *How Did Life Begin?* Nature. 2018 May;557(7704):S13-S15. doi: 10.1038/d41586-018-05098-w. PMID: 29743709.
- TALLINEN T, CHUNG JY, ROUSSEAU F, GIRARD N, LEFÈVRE J AND MAHADEVAN L (2016) *On the growth and form of cortical convolutions*. Nature Physics, 12, 588-593.
- TESSIER-LAVIGNE M, PLACZEK M. (1991). *Target attraction: are developing axons guided by chemotropism?* Trends Neurosci. 1991 Jul;14(7):303-10. PMID:1719678.
- TRAVÉS PG, PIMENTEL-SANTILLANA M, CARRASQUERO LM, PÉREZ-SEN R, DELICADO EG, LUQUE A, IZQUIERDO M, MARTÍN-SANZ P, MIRAS-PORTUGAL MT, BOSCA L. (2013). *Selective impairment of P2Y signaling by prostaglandin E2 in macrophages: implications for Ca2+-dependent responses*. J Immunol. 2013 Apr 15;190(8):4226-35. doi: 10.4049/jimmunol.1203029. Epub 2013 Mar 11. PMID:23479225.
- TRINKLE-MULCAHY L, AND SLEEMAN J.E (2017). *The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”?* RNA BIOLOGY. 2017, VOL. 14, NO. 6, 739–751. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236169>.
- TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M. W., ET AL. (2003). *P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury*. Nature 424, 778–783. doi: 10.1038/nature01786.

VALERA S, HUSSY N, EVANS RJ, ADAMI N, NORTH RA, SURPRENANT A, BUELL G. (1994). *A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP*. *Nature*. 1994 Oct 6;371(6497):516-9. PMID:7523951.

VERKHRATSKY A, BURNSTOCK G. (2014). *Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance*. *Bioessays*. 2014 Jul;36(7):697-705. doi: 10.1002/bies.201400024. Epub 2014 Apr 30. PMID:24782352

VOLKNANDT, W., AND ZIMMERMANN, H. (1986). *Acetylcholine, ATP, and proteoglycan are common to synaptic vesicles isolated from the electric organs of electric eel and electric catfish as well as from rat diaphragm*. *J. Neurochem.* 47, 1449–1462. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb00778.x.

WEBB TE, SIMON J, KRISHEK BJ, BATESON AN, SMART TG, KING BF, BURNSTOCK G, BARNARD EA. (1993). *Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor*. *FEBS Lett.* 1993 Jun 14;324(2):219-25. PMID: 8508924.

WINKLER, H., AND WESTHEAD, E. (1980). *The molecular organization of adrenal chromaffin granules*. *Neuroscience* 5, 1803–1823. doi: 10.1016/0306-4522(80)90031-7

WU Z, MAKIHARA S, YAM PT, TEO S, RENIER N, BALEKOGLU N, MORENO-BRAVO JA, OLSEN O, CHÉDOTAL A, CHARRON F, TESSIER-LAVIGNE M. (2019). *Long-Range Guidance of Spinal Commissural Axons by Netrin1 and Sonic Hedgehog from Midline Floor Plate Cells*. *Neuron*. 2019 Jan 11. pii: S0896-6273(18)31125-5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.025. PMID:30661738

YAMADA RX, SASAKI T, ICHIKAWA J, KOYAMA R, MATSUKI N, IKEGAYA Y. (2008). *Long-range axonal calcium sweep induces axon retraction*. *J Neurosci.* 2008 Apr 30;28(18):4613-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0019-08.2008. PMID:18448637.

YAMAMOTO K, KORENAGA R, KAMIYA A, QI Z, SOKABE M, ANDO J. (2000) *P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Jul;279(1):H285-92.PMID:10899068.

ZABALA A, VAZQUEZ-VILLOLDO N, RISSIEK B, GEJO J, MARTIN A, PALOMINO A, PEREZ-SAMARTÍN A, PULAGAM KR, LUKOWIAK M, CAPETILLO-ZARATE E, LLOP J, MAGNUS T, KOCH-NOLTE F, RASSENDREN F, MATUTE C, DOMERCQ M. (2018). *P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis*. *EMBO Mol Med.* 2018 Aug;10(8). pii: e8743. doi: 10.15252/emmm.201708743.PMID: 29973381

ZIMMERMANN, H., ZEBISCH, M., AND STRATER, N. (2012). *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. *Purinergic Signal.* 8, 437–502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4.





## DISCURSO DE CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA. DRA. ROSA BASANTE POL

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España.  
Excmas. Señoras. y Señores Académicos  
Señoras y Señores.

Me siento muy honrada y agradecida a la Junta de Gobierno de esta Docta Corporación por haberme permitido contestar, en su nombre, al Discurso de ingreso de la Dra. Miras Portugal, no solo por el enriquecimiento, tanto intelectual, científico, y humano, que ello supone para esta Real Academia, sino por considerar a la recipiendaria como un referente de mujer comprometida, avanzada a su tiempo, amante de la libertad, trabajadora incansable y con una arrolladora personalidad, defensora del importante papel que la mujer debe desempeñar en una sociedad, y además amiga de quien les habla.

Mi amistad con la María Teresa Miras se forjó en la Real Academia Nacional de Farmacia, de la que ambas somos académicas de número, y de la que la Dra. Miras fue la primera mujer Presidenta de una Real Academia, de las integradas en el Instituto de España, institución que fomenta la convivencia, el debate, cultivo del saber, y difusión del conocimiento, y a la que sin ambages ambas dedicamos todo esfuerzo posible. He de confesarles que empatizamos, tal vez por nuestro concepto del ser humano, del respeto a los demás, de la importancia del trabajo bien hecho, de lo que supone el rigor y el compromiso en la búsqueda de la excelencia, e incluso por nuestras raíces; galaicas en su caso y bercianas en el mío.

Su gran responsabilidad y honestidad ha quedado puesta de manifiesto en todas las tareas desempeñadas: docentes; investigadoras; de gestión, sin dejar nunca a un lado su parte humana, importantísima como esposa y madre, o volcada en la ayuda a los demás, y ello siempre con una afable sonrisa. De aquí mi admiración por María Teresa Miras.

Abundaré más en el tema, por ello continuaré mi alocución con unas pinceladas biográficas, esbozando a continuación, lo más significativo de su gran tarea docente e investigadora, comentando sucintamente aspectos de su Discurso de Ingreso, para finalizar con un breve epílogo.



## PINCELADAS BIOGRÁFICAS

En las montañas de la Galicia interior, en la provincia de Orense, en la villa de Carballino, “¡oh tierra, antes y ahora, siempre fecunda y bella!”, evocando a Rosalía de Castro, un frío 19 de febrero, de 1948, vino al mundo María Teresa. Su padre, Aurelio Miras, abogado y licenciado en Filosofía y Letras, amaba la lectura y en su casa los libros se encontraban en cualquier lugar de la vivienda, no es extraño pues que imbuyese a sus hijos el gusto por la lectura, como María Teresa comenta en su infancia era frecuente oír a su padre decirles: “Deja eso y coge un libro”. Desde muy niña le apasionaba todo lo relacionado con la naturaleza; plantas, bichos y sobre todo insectos, que gustaba coleccionar. Fue precisamente un libro: *El desierto viviente*, que su padre le regaló a la vuelta de un viaje a Madrid, el que, según testimonio de ella, definió su vocación de “descubridora”, aumentando su inquietud y avidez por aprender de todo lo que su entorno le proporcionaba.

Su madre, Esperanza Portugal, hacía las delicias de su familia, entre otras cosas, preparando suculentos manjares como las, tan de la tierra, “empanadas”, otro punto en común con la Dra. Miras pues mi madre, también ama de casa, las prepara aun en mi Cacabelos natal.

Tras cursar el bachillerato elemental en Colegio de las madres Franciscanas de su villa natal, se trasladó a Santiago de Compostela para realizar los estudios correspondientes al bachiller superior y al preuniversitario, como alumna interna en el Colegio de la Compañía de María. Era un reto pues pasaba de una libertad plena en un ambiente rural y en plena naturaleza a un ambiente en que la libertad estaba más “limitada”, a espacios cerrados. Todo ello forjó su voluntad y superó el reto, como todos los retos que ha tenido, con creces. Aprendió, en palabras suyas, que: “ser libre es una cuestión del pensamiento”.

El Palacio de Fonseca, sede de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, sería su próximo destino. En 1965 comenzó allí los estudios correspondientes a la Licenciatura de Farmacia. El primer curso era Selectivo, pocos alumnos pero con grandes ansias por aprender. María Teresa se presenta a unos exámenes para ser candidata a alumno interno y consigue entrar en la Catedra de Química inorgánica, que dirigía D. Jaime González Carreró, presagio tal vez de su vocación docente, aprendió y gustó de la trasmisión de conocimientos. Además de Carreró otros profesores le dejaron su impronta; D. Pablo Sanz, Matías Mayor, Luis Alias Josafat, Benito Regueiro o Montañés.

Su inquietud intelectual la llevaba a compaginar el estudio con actividades deportivas y teatrales, de la propia Universidad, integrándose en el grupo de teatro y en el equipo de balonmano.

Solo tres cursos universitarios permaneció en Santiago, el amor pudo más. “*ama y haz lo que quieras*” que dijo San Agustín. María Teresa estaba enamorada de su novio Fernando Varela, ¡gran matemático!, quien había aprobado las oposiciones a catedrático de Instituto y estaba realizando su tesis doctoral en la Universidad Complutense. Se casaron y trasladaron

a vivir a Madrid, en cuya Universidad finalizó los estudios de la licenciatura en Farmacia, en 1970, con Premio Extraordinario y Premio Nacional Fin de Carrera.

Inicia sus estudios de Doctorado bajo la dirección de la investigadora Pilar González y de nuevo la importancia de la familia en la vida de María Teresa fue incuestionable, supo conciliar su vida familiar y laboral, no sin superar grandes obstáculos. Su esposo había sido aceptado en el famoso Instituto de Investigación de Matemática Avanzada de Estrasburgo (IRMA) y ella quería acompañarle, junto a su hijo de tan sólo tres meses, lo cual no había de impedirle seguir su vocación investigadora.

Tesón, esfuerzo, energía y voluntad no le faltaban, consiguiendo, por su buen expediente, ser aceptada en el Centro de Neuroquímica de Estrasburgo siendo becada, además, por el gobierno francés. Valladares sorteados pero, como ella misma relata: “la búsqueda de guardería para su hijo Fernando fue una odisea que por sí sola merecería una gran obra”.

Fue consciente del privilegio de formarse con grandes maestros: Paul Mandel; Pierre Chambón; Gerard Mack... y creo que hizo suya la frase de Cajal: “*marchar humildemente detrás de los sabios, para poder marchar algún día en su compañía...*”

En 1973 nació su segundo hijo, Alberto, un nuevo motivo de alegría y superación, la investigación avanzaba y en julio de 1975, en la Universidad de Estrasburgo, defendió su tesis doctoral titulada: *la dopamine-B-hydroxylase (EC1.14.17.1) du serum humain*, de magna cum laude, y felicitaciones del jurado.

Poco después la familia Varela Miras se traslada a Madrid, y la Doctora Miras se incorpora al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, con un contrato del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Un nuevo reto, personal y científico, para una mujer luchadora y valiente, consciente del importante papel que la mujer ha de desempeñar en la Sociedad de su época.

Un gran futuro como investigadora se vislumbraba para la Dra. Miras. Tal vez, parafraseando a Antoine de Saint- Exupery, “*No se trata de prever el futuro sino de hacerlo posible*” y ella con su trabajo, lo hizo posible.

## ACTIVIDAD DOCENTE E INVESTIGADORA

La Dra. Miras Portugal siempre gustó “*Tratar con quien se pueda aprender...*”, que dijo Baltasar Gracián. Muchos y valiosos fueron sus maestros, de todos procuró aprender el valor del esfuerzo, la dedicación, y el trabajo en equipo para lograr los objetivos propuestos, aun a sabiendas de que: “*ningún camino de flores conduce a la gloria*” en palabras de La Fontaine.

Iniciada su actividad docente- investigadora en la Facultad de Farmacia de la UCM, en la que obtiene su segundo doctorado, pasa luego a la Autónoma de Madrid y a la Universidad de Oviedo, para con tan solo 34 años obtener, en 1982, por oposición, la Cátedra de Bioquímica en la Universidad de Murcia, en la que permanece cuatro años, y de nuevo otra oposición, a la cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la UCM, que supera, obviamente. En esta Facultad continua su prestigiosa tarea investigadora y consigue nuclear un importante grupo de investigación, en Neurociencias, con una extraordinaria producción científica. Su proyección internacional es ya indiscutible.

Y no solo en universidades españolas, sino que varios centros europeos y americanos fueron lugares de trabajo en los que la Dra. Miras dejó su impronta: Instituto de Ciencias de Kiev; Instituto Gulbenkian; Royal free Hospital de Londres; Universidad de Dusseldorf; Universidad Goethe o el Instituto de Salud Americano (NIH).

No es extraño pues la pertenencia de la Dra. Miras a instituciones científicas españolas: Real Academia Nacional de Farmacia; Real Academia de Ciencias Veterinarias; Real Academia de Farmacia de Cataluña, o internacionales cuales : Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina; European Academy of Arts, Sciences and Humanities( EAASH); Académie Européenne des Sciences, des Arts et des Lettres ( AESAL ) ; Académie National de Pharmacie de France y Academia Europea.

El reconocimiento a su importante trabajo se ha materializado del mismo modo en galardones cuales: El premio en Ciencias Biomédicas de la CEOE; el de Investigación de la Xunta de Galicia; El de Arenteira Científica; La Medalla Castelao; el de Investigación a la Carrera Científica de la Comunidad de Madrid, por citar tan solo algunos.

Es Doctor Honoris Causa por varias universidades españolas.



## EL DISCURSO

En su discurso la Dra. Miras nos lleva a través del sistema nervioso para conocer un nuevo grupo de neurotransmisores, sus funciones, sus problemas y la importancia de que funcionen correctamente.

Trata de explicar con sencillez, la complejidad que envuelve cada uno de los descubrimientos, por pequeños que sean, cuando se trata de estudiar el sistema nervioso. Nos descubre que los neurotransmisores, en este caso nucleótidos, están entre las moléculas más antiguas que hayan existido en nuestro planeta, y necesarios para formar los primeros organismos prebióticos y participes en ese mundo del RNA, el más primitivo en la evolución y que todavía conservamos en las funciones más relevantes de nuestras células. Incluidos los cuerpos de Cajal, estructuras nucleares que 110 años más tarde empezamos a comprender su función en ese mundo primitivo. Y su sorpresa cuando uno de los receptores que ha estudiado, muestra una distribución análoga a la de los cuerpos de Cajal.

Cuando Cajal postula la teoría de la neurona y que tienen que comunicarse químicamente, todavía no se habían descubierto los neurotransmisores, pero se buscaron intensamente y aparecieron, acetilcolina, catecolaminas, y toda una serie de diversos compuestos. Hoy en día esa comunicación es mucho más compleja de lo supuesto, pues un neurotransmisor nunca actúa solo y al liberarse de su terminal sináptica, es todo un grupo que va a actuar generalmente en armonía. Pero muchísimo más complejo de comprender. Ese es el caso de los neurotransmisores que estudia, los nucleótidos, el famoso ATP, *siempre va en compañía de otros*.

En el estudio del sistema nervioso llegamos hasta donde llega la tecnología, pero resulta sorprendente que Cajal lo imaginara. Cuando lee su discurso de Premio Nobel en la Academia Sueca, después de mostrar su deslumbrante trabajo anatómico, pero habiendo hecho los dibujos con tinta a mano, deja constancia de lo que vendría en el futuro: *“Con el tiempo, nuevas técnicas descubrirán algún proceso de coloración capaz de revelar nuevas y más íntimas conexiones entre las neuronas”* (Ramón y Cajal, 1906). ¿Con el mapa del conectoma humano, el ratón arcoíris, o la tinción específica para cada tipo neuronal o astrogial, que habría sentido Cajal? ¿Pensaría que este era su tiempo?

Con un ratón verde para uno de los receptores, reportero fluorescente, la Dra. Miras puede ver cómo crecen los axones en el cerebro, como proliferan las neuronas del hipocampo dañado en el estado epiléptico y como alargan sus axones para conectarse a otras, en esa estructura que filtra nuestras memorias y recuerdos.

Sin duda la tecnología es importante, pero hay que tener problemas interesantes e ideas que desarrollar, de otro modo se cae en una rutina costosa y que no aporta soluciones a problemas reales, esa es la opinión que la Dra. Miras nos deja en su discurso.

Disfruta imaginando las nuevas posibilidades que se abren en esta área, ya que son los propios investigadores los que tienen que mover las fronteras para comprender todos los aspectos fisiopatológicos de los receptores de las familias 2X y la 2Y. El disponer de quizás el mejor fármaco para prevenir el ictus y la formación de trombos, el Plavix, que ahora tienen un arsenal de fármacos análogos que se unen al receptor Y12, ha sido el detonante para que las grandes empresas farmacéuticas se hayan volcado con estos receptores.

La Dra Miras, incluye en su discurso una serie de datos que nos hacen reflexionar, sobre la sociedad en la que vivimos, hemos pasado de ser una tribu a un conglomerado de 10.000 millones de habitantes, y nuestro cerebro contiene 100.000 millones de neuronas y 5 veces más de astrocitos. Disfruta de la ciencia, que necesita ser transmitida y que solo se valora cuando se experimenta la dificultad de sacarle a la naturaleza alguno de sus secretos.



## EPÍLOGO

En síntesis una mirada al extenso, e importantísimo, currículum de la Dra. Miras Portugal, deduce su vasto bagaje multicultural y científico y el porqué del puesto que ocupa en el mundo científico, líder incuestionable en investigaciones en neurociencia, orgullo para cualquier docente e investigador y sobre todo para las mujeres.

No es extraño que se demande su presencia en foros nacionales, e internacionales, sin menoscabo de su extraordinaria labor como gestora de instituciones, tanto académicas como científicas, y todo ello conciliándolo con su papel de esposa y madre, ejemplo de “sabiduría y compromiso” en palabras de la Dra. M José Alonso Fernández, ¡Una gran mujer!

Decía Albert Einstein que: *“la motivación más importante para trabajar tanto en la escuela como en la vida, es el placer en su resultado y el valor de dicho resultado para la comunidad.”*, Sinceramente creo que la Dra. Miras ha disfrutado con los resultados de sus trabajos, sobre todo por su proyección en la sociedad a la que nos debemos, contribuyendo con ello a salvaguardar el derecho constitucional de “protección a la salud”.

Finalizo dirigiéndome a la Dra. M. Teresa Miras Portugal:

En este jubiloso acto, tomáis posesión de una plaza como Académico de Número de la Real Academia de Doctores de España, integrándoos y enriqueciendo su comunidad científica e investigadora, cuyo objetivo es trabajar, de modo altruista, por el bien común. ¡Ese es el reto!

Gran satisfacción es para mí daros, en nombre de la Institución, la enhorabuena y bienvenida a esta nuestra, vuestra, casa, en la que os deseo larga vida, y provechoso y enriquecedor trabajo.

He dicho





