



ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso como Académica Correspondiente

SEÑALIZACIÓN POR NUCLEÓTIDOS: NEUROGÉNESIS, NEUROPROTECCIÓN Y REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

EXCMA. SRA. DOÑA
M^a TERESA MIRAS PORTUGAL

La presentación será a cargo de la
Académica de Número:

EXCMA. SRA. DOÑA MARÍA JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ



Santiago de Compostela
14 de marzo de 2018

© M^a Teresa Miras Portugal
Imprime y edita: Beaprint, S.L.

ISBN: 978-84-946424-8-7
Depósito Legal: M-5635-2018

ÍNDICE

Discurso de presentación por la Excma. Sra. Doña M ^a José Alonso Fernandez	5
Preámbulo	11
1. Introducción histórica a los compuestos purinérgicos y nucleótidos en señalización extracelular	13
1.1. El esquivo y largo camino de la señalización por nucleótidos en una ameba social.	15
1.2. Compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos, el gran avance de la química.	17
1.3. Tradición y osadía: ensayos en humanos de los efectos de la adenosina y el ATP.	20
1.4. La neurogénesis del adulto sus primeros balbuceos.	23
2. Aspectos generales de la señalización purinérgica y la razón de su complejidad.	27
2.1. Almacenamiento vesicular de los nucleótidos y su liberación	30
2.2. Presencia de VNUT en tejidos neurales: su relación con el desarrollo del cerebelo.	35
2.3. Los receptores de nucleótidos, familias P2X y P2Y, generalidades.	39
2.3.1. Receptores metabotrópicos P2Y	41
2.3.1.1. Importancia de los Receptores P2Y12 y P2Y13	43
2.3.2. Receptores ionotrópicos P2X	46
2.3.2.1. Estructura de los Receptores ionotrópicos P2X	47
2.3.2.2. Agonistas y antagonistas de Receptores ionotrópicos P2X	49
2.3.2.3. ¿Los diadenosina y diinosina polifosfatos cuál es su función sobre los receptores P2X?	51
2.3.2.4. Importancia de los inhibidores del Receptor P2X7	53
2.3.2.5. Cascadas de señalización de los receptores ionotrópicos P2X.	55

2.4. Degradación extracelular de los nucleótidos por ecto-nucleotidasas.	58
3. Implicación de los nucleótidos en la fisiopatología del sistema nervioso. ...	63
3.1. Receptores P2Y2 y P2X7, el ying y el yang en las placas de β amiloide.	65
3.2. Alzheimer y el lio de los ovillos neurofibrilares, la proteína tau extracelular, los receptores muscarínicos y la fosfatasa alcalina: Una sorpresa con lógica.	68
3.3. Crecimiento de los axones y regeneración axonal, la importancia del receptor P2X7.	71
3.3.1. En el cono de crecimiento el P2X7 está acompañado del P2Y1 y el P2Y13.	74
3.3.2. ¿Cómo consigue crecer un axón en el cerebro fetal si en el medio extracelular hay ATP? Función de la TNAP	76
3.4. Nucleótidos en neuroregeneración y neuroprotección.	78
3.4.1. Señalización purinérgica en la reparación de la medula espinal lesionada.	79
3.4.2. Factores nucleares implicados en la regeneración nerviosa y su relación con la señalización purinérgica.	81
3.4.3. Progenitores de la zona subventricula y receptores de nucleótidos en cerebro adulto.	83
3.4.4. Receptores P2X y P2Y en neuroprotección.	85
4. Consideraciones finales.	87
Bibliografía	89

Discurso de Presentación
de la Excma. Sra. Doña M^a Teresa Miras Portugal
Presentada por la Excma. Sra. Doña M^a José Alonso Fernández

Acto de Ingreso como Académica Correspondiente
en la Academia de Farmacia de Galicia
Santiago de Compostela, 14 de marzo de 2018

Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia,
Excelentísimos Académicos/as, autoridades, señoras y señores,

Es para mi todo un honor participar en este solemne acto, presentando a la Exma. Sra. Doña María Teresa Miras Portugal, por quien siento un sincero afecto y una gran admiración. Cuando María Teresa me lo pidió, y el Sr Presidente me concedió este privilegio, me sentí emocionada porque María Teresa ha sido para mí un referente como científica, como académica y como mujer.

Por todo ello, quiero agradecer en primer lugar a los Excmos. Señores Académicos, Don Manuel Puga Pereira, Don Jesús Izco Sevillano y Don Isaac Arias, por proponer su ingreso en esta Academia. Agradezco igualmente al conjunto de académicos que acogieron la propuesta con gran entusiasmo, entendiendo así que con el ingreso de la Dra. Miras Portugal, esta Real Academia se enriquece de su sabiduría y adquiere una mayor proyección internacional. Por último, quiero agradecer a los familiares y amigos de María Teresa y a los amigos de esta Academia, que se han desplazado desde diferentes lugares para acompañarnos en este acto.

Conocí personalmente a María Teresa hace 12 años en una mesa redonda sobre la investigación en España y unos meses más tarde en la Real Academia de Farmacia, donde tuve el honor de impartir una conferencia. En estos momentos fugaces pero intensos, surgió una gran empatía entre nosotras, lo que me hizo muy feliz ya que, sin haberla tratado, yo sentía por ella una gran admiración. Sentía una gran admiración no sólo por su reconocido papel en la vanguardia de la ciencia en España, sino también por el hecho de haber conseguido ser la primera mujer en la Historia que ocupa el cargo de Presidenta de una Real Academia Española (RANF). Este es, sin duda, un logro extraordinario si tenemos en cuenta la representación testimonial que la mujer tenía en las reales academias cuando María Teresa ingresó en la RANF (2001). Desde entonces, María Teresa ha sido para mí un modelo a seguir, alguien que me hace sentir que la mujer ha de ocupar el papel que le corresponde en la sociedad y que es el de dar lo mejor de sí misma por los demás. Prueba de esa especial sintonía fue su petición memorable de que realizara su semblanza cuando en el acto de entrega, en el año 2008, del premio “Josefa Wonenburger” concedido por la secretaría de Igualdade de la Xunta de Galicia. Éste es un recuerdo inolvidable por el que le estoy muy agradecida pues marca una década a lo largo de la cual hemos forjado una amistad que me ha permitido disfrutar de su sabiduría, compromiso y entusiasmo. Como tal entusiasta de María Teresa, he seguido con agrado su trayectoria curricular, a la vez que me he interesado por sus opiniones y su visión sobre temas de la vida en general o de la universidad y la ciencia en particular. Cuando uno recurre a la web se da cuenta que el número de referencias sobre María Teresa no pasa inadvertido.

Estamos hablando de una mujer con una personalidad arrolladora, de una chica que allá por los comienzos de los 70 termina sus estudios de Farmacia y decide trasladarse a Estrasburgo para realizar allí sus estudios de doctorado. Estamos hablando de un momento

histórico en el que la práctica totalidad de los estudiantes de Farmacia orientaban su actividad a la oficina de Farmacia y de un momento en el que la presencia de la mujer en el cuerpo de profesorado de la universidad era simbólica. Pero, María Teresa tenía la energía y sentía una inquietud y una curiosidad por la investigación que la llevaría a realizar un doctorado en neurociencias en la Universidad de Estrasburgo y a su vuelta a España un segundo doctorado en la misma línea en la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. A partir de ahí, y a pesar de las dificultades de financiación de la investigación que se daban en aquel momento, María Teresa sale adelante porque su capacidad de lucha, su interés por enseñar y su curiosidad ante el descubrimiento son de tal magnitud que en pocos años se convierte en líder indiscutible de la investigación en neurociencias. Con tan sólo 34 años y después de un largo recorrido por varias universidades españolas (Universidad Complutense de Madrid, Universidad Autónoma de Madrid y Universidad de Oviedo), María Teresa consiguió la plaza de Catedrática de Bioquímica en la Universidad de Murcia y años más tarde en la Universidad Complutense de Madrid, donde ha nucleado uno de los más importantes equipos investigadores en Neurociencias en España. Esta trayectoria de persona amante de los cambios y de los retos ha sido una nota dominante en su recorrido profesional. De hecho, además de su paso por varias universidades españolas María Teresa ha trabajado en varios centros europeos (Universidad de Dusseldorf, Universidad Goethe, Instituto de Ciencias de Kiev, Royal free hospital de Londres, Instituto Gulbenkian) y americanos, como el Instituto de Salud Americano (NIH). Sinceramente creo que María Teresa es única en su bagaje multicultural y científico y que es esa gran experiencia la que le da esa sabia visión de la vida y del mundo científico-académico.

El perfil curricular de María Teresa habla de una gran científica, una gran docente y sobre todo una gran persona. Esta manera

de ser ha tenido sus consecuencias lógicas en la formación de sus discípulos, quienes la reconocen por su saber cautivar, comunicar, liderar y gestionar. Todo esto con su sentido del humor y su característica sonrisa. En cuanto a mi experiencia personal reitero mis palabras recogidas en una semblanza que hice sobre María Teresa en el diario El País: *“Cuando estás con ella, se establece de inmediato una comunicación franca y afable, sabes que recibes de ella mucho más de lo que expresan sus palabras. Al tratarla te das cuenta de lo que hay detrás de esa gran mujer que sabe compaginar con delicia la autoridad y el afecto. Un carácter así solo se configura con una trayectoria excepcional; o mejor dicho, una trayectoria así no es fruto de un carácter conformista y pasivo, sino de alguien que no deja pasar una oportunidad en su vida, que la vive siendo consciente de que tiene mucho por lo que esforzarse”*.

Simplemente con el ánimo de arrojar unas cifras objetivas ilustrativas de su perfil biográfico, cabe destacar el hecho de haber dirigido 40 proyectos de investigación, asociados a los cuáles se han formado 24 doctores, además de un amplio número de investigación de formación. Esta labor investigadora se ha traducido además en 258 artículos científicos publicados en revistas prestigiosas en su ámbito, además de 45 ejemplares de libros, monografías y discursos. La atención suscitada por estas publicaciones se refleja en el número de citas de que han sido objeto, que se cifra en 8.843 (Índice H = 53) a fecha de 21 de febrero, 2018 (Google Académico).

Con esta trayectoria es fácilmente comprensible que María Teresa sea llamada continuamente a impartir conferencias en todo el mundo (131 ponencias pronunciadas en congresos) y también para la organización de numerosos eventos científicos (30 eventos científicos, incluyendo congresos, seminarios y talleres de trabajo).

Asimismo, su capacidad de liderazgo y de gestión la ha llevado a puestos electos de dirección en numerosas sociedades científicas entre las que destaca su responsabilidad como Presidenta del Comité científico de la International Society for Neurochemistry (ISN) y a su participación en varios comités editoriales, como es el del Journal of Neurochemistry.

Sobresaliente es el hecho de que Maria Teresa haya sido capaz de combinar toda esta actividad docente e investigadora con la importante responsabilidad que ha tenido como presidenta de la Real Academia de Farmacia (la única presidenta de una Academia en España). Los que procedemos del mundo de la farmacia reconocemos que el trabajo realizado por ella ha contribuido notablemente al acercamiento de la Academia a la sociedad y a su internacionalización. Ello lo consiguió no solo atrayendo a excepcionales académicos, sino también a través de la organización de debates científicos del más alto nivel y estableciendo relaciones con las academias europeas y americanas más activas. En conjunto, Maria Teresa contribuyó al esplendor de la Academia aportándole un ambiente afable pincelado del sentido del humor que la caracteriza, siempre con su entrañable sonrisa.

A su actividad de gestión hay que añadir además su participación en los comités científicos y jurados de las distinciones más notables en España como son el Premio Príncipe de Asturias o el Premio Jaime I. Particularmente relevante ha sido también su papel como Presidenta del Comité Ministerial para la reforma y mejora de la calidad y eficiencia del sistema universitario español 2012-2013. Fruto de este trabajo ha sido la elaboración de un informe llamado a tener un gran impacto en la transformación tan ansiada como necesaria de nuestra universidad.

Esta extraordinaria actividad se ha visto reconocida de diversas formas. Por ejemplo, en su *curriculum vitae* constan 16 premios

y reconocimientos, entre los que me parece importante destacar la Medalla Castelao, máxima distinción de la Xunta de Galicia, en el año 2016.

Además de sus cargos en la RANF, desde 2001 como Académica y entre 2007-2012 como presidenta de dicha academia, ha sido nombrada Académica de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España, de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y de la Academia de Ciencias de Murcia. En un contexto internacional destaca su nombramiento como miembro de la Academia de Ciencias de la URSS, de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina, de la “European Academy of Arts, Sciences and Humanities », de la “European Academy / Academy of Europe. Section C3 Physiology and Medicine” y de “L’Academie Nationale de Pharmacie de France”. Además ha sido Miembro de la Junta Rectora del Instituto de España.

En definitiva, estamos ante una no excelente sino excelentísima –como corresponde a su cargo– profesional y también excelentísima persona. Es todo un honor para esta Academia que haya accedido a formar parte de la misma. Estoy convencida de que su pertenencia a esta Academia contribuirá a ampliar su esplendor, no solo por su sabiduría, sino también por su personalidad y extraordinaria proyección internacional. Y me gustaría terminar con unas sencillas, pero cargadas de significado, palabras recogidas en un documento publicado por la unidad de Mujer y Ciencia de la Secretaría de Igualdade de la Xunta de Galicia: MARIA TERESA MIRAS PORTUGAL, UN EJEMPLO DE SABIDURÍA Y COMPROMISO

HE DICHO.

PREÁMBULO

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia

Excmos. e Ilmos. Señores y Señoras Académicos.

Excmas. e Ilmas. Autoridades

Señoras y Señores,

Queridos Amigos.

Sean mis primeras palabras en este discurso de entrada como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia de agradecimiento. En primer lugar, supone un gran honor ser presentada en esta Academia por una excepcional investigadora, a quien además considero compañera y amiga, la Excma. Señora Doña Ma José Alonso Fernández, por ello quiero dejar constancia de mi admiración hacia su trabajo pionero en la ciencia farmacéutica, mi sincero agradecimiento por su amistad y afecto, que es sin duda reciproco y haciendo notar que su afecto y cariño han sin duda exagerado mis méritos.

Agradecimiento al Excmo. Sr. Don Manuel Puga Pereira, Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia, por quien siento una profunda admiración por su labor continuada y exitosa al frente de esta noble institución, en estas épocas tan difíciles de navegar para las instituciones comprometidas con la cultura y la ciencia. Añadiré que a su gran calidad humana se debe que me haya brindado su amistad, lo que agradezco emocionada, pues Galicia es mi tierra y gallega soy.

Agradecer sinceramente a los Excmos. Señores Académicos de Número Don Jesús Izco Sevillano, Don Isaac Arias, anterior presidente de esta Academia y de nuevo a Don Manuel Puga Pereira por

haber presentado mi candidatura. Agradecimiento que hago extensivo a todos los Académicos de esta noble Institución, que me han aceptado en su seno.

Entrar en La Academia de Farmacia de Galicia supone reencontrarme con mis años de estudiante en la Facultad de Farmacia de Santiago, cuando aún habitábamos el Palacio de Fonseca. Allí hemos dejado algo de nosotros mismos y de ello darán cuenta los arcos del claustro plateresco, cuando empiecen a contar sus historias.

En el largo viaje emprendido durante mi trayectoria científica y docente, desde hace casi 40 años, pasando por países y ciudades, he tenido la suerte de compartirlos con mi esposo, Fernando Varela, gran matemático y gallego en fondo y forma, y con nuestros hijos Fernando y Alberto. En el periplo de mi vida, como buena gallega, me acompañaba, en el sentir, el paisaje y aroma de esta tierra. Estudiando en Compostela comprendí que lo universal en el conocimiento tiene un componente peregrino y que ser un ciudadano del mundo, supone ser capaz de absorber y comprender lo que hay de bueno en cada lugar que nos acoja. Hoy, vuelvo aquí, al inicio, y descubro entusiasmada que estoy en casa.

Gracias por acogerme.

Santiago de Compostela, 14 de marzo de 2014.

M^a Teresa Miras Portugal.

1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA A LOS COMPUESTOS PURINÉRGICOS Y NUCLEÓTIDOS EN SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR

Los estudiantes de ciencias de la vida, desde hace más de un siglo, hemos crecido considerando al trifosfato de adenosina o adenosín trifosfato, por sus siglas ATP, como un prodigioso compuesto capaz de ser el árbitro de la bioenergética y del metabolismo celular, siendo además el sillar esencial, junto con sus derivados, de nuestro material genético y su expresión, todo ello dentro de las células vivas. Tan importantes son sus funciones intracelulares que se consideró como grave heterodoxia cualquier posibilidad de acción fuera de la célula. Todas las evidencias científicas sobre sus capacidades de señalización extracelular se rechazaban de plano, o eran tergiversadas, por ello el esclarecimiento de sus importantes acciones fisiológicas y la caracterización de sus receptores de membrana necesitaron vencer una ardua resistencia entre la comunidad científica. La existencia de dogmas inamovibles es contraria a la ciencia, pero muchas veces está enraizada profundamente y es necesario esperar hasta que la evidencia experimental acumulada se impone, es una cuestión de tiempo. Quizás, por ello, las acciones extracelulares del ATP y otros nucleótidos son, hoy en día, un campo extraordinariamente fértil donde está casi todo por descubrir.

En sus inicios, los que trabajábamos en el área de la señalización mediada por los nucleótidos y nucleósidos de purina, conocidos como purinérgicos, éramos conscientes de que poco a poco, estaba empezando a abrirse camino, siendo el Profesor Bertil Fredholm el más visible de los investigadores en las acciones de señalización por adenosina y el Professor Geoffrey Burnstock la cabeza más visible de la función de los nucleótidos extracelulares.

En el año 1989 la New York Academy of Sciences, da un rotundo respaldo a esta nueva área de investigación, organizando un congreso titulado 'Biological Actions of Extracellular ATP'. Los participantes éramos gente muy ilusionada, conscientes de estar en la línea de partida. La ocasión fue celebrada por uno de los asistentes, el profesor Samuel C. Silverstein, leyendo el siguiente poema:

*Oh tell me Lord how could it be,
That though our cells make ATP,
It's not all used for energy,
But sometimes is secreted free.
It puzzles you, it puzzles me,
While Geoffrey Burnstock smiles with glee
At the many roles of ATP.*

Sirvan las acciones extracelulares del ATP como ejemplo para los investigadores en ciencias de la vida, que necesitan del convencimiento de que en todo proceso creativo el cambio de paradigma es una de sus premisas y la puerta a lo desconocido se abre derribando los dogmas.

Otro gran dogma con el que hemos crecido los estudiantes de ciencias de la vida y neurociencias, fue el de la ausencia de neurogénesis en el adulto. Cuando Altman y su grupo en 1965, publican tímidamente el primer trabajo, al que no se prestó atención y permaneció ignorado durante mucho tiempo (Altman and Das, 1965). En la actualidad ese dogma también ha sido derribado.

Nos proponemos en este discurso poner al día y evaluar la importancia del sistema purinérgico en sus diversas etapas del desarrollo del sistema nervioso, la neurogénesis y neuroprotección y la reparación del sistema nervioso, mediante sus acciones extracelulares.

1.1 El esquivo y largo camino de la señalización por nucleótidos en una ameba social.

Incomprensiblemente el rechazo al ATP y otros nucleótidos como moléculas de señalización extracelulares tenía un punto de cabezonearía científica. En ciencia siempre han sido necesarios los modelos de estudio y desde la humilde bacteria, *Escherichia coli*, al eucariota más pequeño, la levadura de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, han servido para comprender los mecanismos comunes a todos los seres vivos, independientemente de su tamaño y complejidad.

En nuestro caso la historia surge de los estudios de John Tyler Bonner, quien en 1947 describe que el *Dictyostelium discoideum*, un protista ameboide, organismo unicelular en condiciones favorables, era capaz de agregarse en condiciones adversas formando los cuerpos fructíferos, que generaban las esporas de supervivencia esperando las siguientes lluvias. Esta ameba social, fue un modelo muy utilizado para comprender los mecanismos implicados en la formación del trombo plaquetario en las hemorragias y la importancia del citoesqueleto para el movimiento e interacciones de las células del sistema inmune.

Veintitrés años más tarde, en enero de 1970, el mismo J.T. Bonner, después de un intenso trabajo científico, descubre que el responsable de la agregación de estas amebas sociales es el AMP cíclico, cAMP, un derivado mucho más estable y resistente que el ATP o el ADP a las hidrólisis extracelulares. Estos descubrimientos son publicados en los *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS*. La liberación de este nucleótido se producía por oleadas, creando un gradiente de concentración cuando escaseaban las bacterias que estaban en el medio, que constituían su alimento. Era evidente que el nucleótido cíclico tenía que ser detectado de algún modo mediante receptores, y que la señal generada

les indicaba que era necesario cooperar y formar esporas para la supervivencia. Todas estas suposiciones requerían de la existencia de receptores de membrana.

No fue hasta mucho más tarde, en el año 1992, en que se identificaron 3 de los 4 receptores de membrana para el AMPc, eran los clásicos de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G (Johnson et al. 1992). Curiosamente un año más tarde, en 1993, se clonaron los primeros receptores de nucleótidos de tejidos animales, el P2Y1 de cerebro de pollo y el P2Y2 de un neuroblastoma de ratón (Lustig et al. 1993, Webb et al. 1993). Es como si la identificación de los receptores de nucleótidos hubiera estado esperando a que el organismo más primitivo, evolutivamente hablando, fuera el primero en ser identificado. Posteriormente se caracterizaron las cascadas de señalización que llevaban a los cambios dinámicos de la geometría del *Dictyostelium* (Dormann et al. 2001; Raisley et al. 2004). Finalmente en el año 2005 se concluyó la secuenciación del genoma del *Dictyostelium discoideum* permitiendo entender la complejidad del organismo que reúne a sus células y fructifica, para no morir (Eichinger et al, 2005). Sabemos además que la señalización por nucleótidos y nucleósidos de purina se encuentra entre las más primitivas desde el punto de vista evolutivo (Burnstock and Verkhatsky, 2009).

1.2. Compuestos purinérgicos y pirimidinérgicos, el gran avance de la química.

El primer compuesto con la estructura del anillo de la purina, purinérgico, fue aislado por el farmacéutico sueco Carl Wilhelm Scheele el año 1776 a partir de cálculos renales, que es el ácido úrico. (Scheele, V. Q. *Examen Chemicum Calculi Urinari, Opuscula, 1776, 2,73*). Los humanos carecemos del enzima uricasa y excretamos el anillo de purinas como ácido úrico. El incremento de este ácido en sangre, al ser muy poco soluble, produce precipitaciones en las articulaciones causando la artritis aguda, también conocida como gota.

El ácido úrico, causante de la gota bien merece una historia, absolutamente aleccionadora, con 100 años de horizonte en ciencia. Entre todos los mamíferos solamente los humanos y los primates excretamos ácido úrico, el resto de los mamíferos lo excretan como alantoina que es un compuesto mucho más soluble, lo que fue descrito por Hunter & Givens en una época tan temprana como 1914. La explicación de esta singularidad necesitó casi 100 años en ser comprendida. Sabemos hoy día que el enzima uricasa se encuentra en los peroxisomas hepáticos, a donde el ácido úrico tiene que entrar para ser metabolizado a alantoina (Vitart *et al.*, 2008). Desde hace unos 60 millones de años, los peroxisomas del antepasado común, en el árbol evolutivo de humanos y primates, carecen de actividad uricasa, también denominada urato oxidasa. Ello se debe a mutaciones en el gen ancestral que codifica por el enzima (UOX), conduciendo a su silenciamiento (Safra *et al* 2005).

Para compensar la mala prensa del ácido úrico, algunos investigadores, basándose en sus propiedades antioxidantes, lanzaron la hipótesis de que fue un factor esencial durante la evolución de los primates (Ames *et al.* 1981). Siendo un factor de defensa contra el envejecimiento y el cáncer, capaz de proteger las células de los en-

dotelios del estrés oxidativo externo y el sistema nervioso central del daño oxidativo en condiciones extremas (Sautin and Johnson, 2008).

Una sorprendente coincidencia en estos compuestos es la identificación del transportador del ácido úrico presente en la membrana plasmática del hepatocito y de las células de los túbulos renales. El primero identificado fue el SLC2A9 y fue clonado en 2008. Este transportador está codificado en el gen SLC22A12, actualmente se han caracterizado otras variantes, SLC22A11, etc, cada una con localización y función específica (Bannasch et al. 2008). El mismo año el grupo de Moriyama en Japón clonó y caracterizó el VNUT, transportador de nucleótidos vesicular, producto del gen SLC17A9 esencial para el almacenamiento en vesículas secretoras del ATP, lo que permite su secreción cuantal por exocitosis en tejidos neurales y neuroendocrinos (Sawada et al. 2008). El metabolismo y la señalización también avanzan a la par, señalar que actualmente la farmacología de este transportador está en el punto de mira de las compañías farmacéuticas, como veremos en el desarrollo de esta historia (Moriyama and Nomura, 2017).

A finales del siglo XIX un gran número de compuestos púricos y pirimidínicos habían sido identificados y Emil Fisher recibió el Premio Nobel de química en 1902, en gran medida gracias a sus estudios sobre las estructuras purínicas de las bases xánticas (Fisher 1881; 1907) La cafeína es una de ellas y fue de vital importancia, ya que es el antagonista natural, para diferenciar los receptores de adenosina de los receptores de nucleótidos. El gran potencial farmacológico de los antagonistas de los receptores de adenosina debe sus inicios a comprender las acciones de la cafeína a nivel del Sistema Nervioso Central (Fredholm 2003).

La adenosina monofosfato, AMP, aislado del musculo esquelético fue el primer nucleótido descrito (Embden and Zimmermann

1927). La adenosina 5'-trifosfato, ATP, fue descubierto en 1929 y dos grupos independientes se disputan su descubrimiento el de Karl Lohmann en Alemania y el de Cyrus Hartwell Fiske y Yellagapada SubbaRow en Estados Unidos (Fiske and SubbaRow 1929; Lohmann 1929). Su excepcional relevancia sería puesta de manifiesto cuando Fritz Lipman introduce el concepto de enlace fosfato de alta energía, abriendo el horizonte para comprender el excepcional papel del ATP en la bioenergética celular y la estrecha conexión entre la bioquímica metabólica y la biofísica (Lipman 1941).

La relevancia de los nucleótidos de adenina, fundamentalmente el ATP, en el metabolismo y como componentes estructurales de partida para los ácidos nucleicos, apantallaron durante casi un siglo la importancia como mensajero extracelular y sus mecanismos de señalización.

1.3. Tradición y osadía: ensayos en humanos de los efectos de la adenosina y el ATP.

Con el desarrollo inicial de la química orgánica muchos productos naturales fueron identificados y otros muchos sintetizados. Entre ellos compuestos de gran valor farmacológico, que siguen teniendo uso en la actualidad. Lo que sorprende es como llegaron a tener evidencia de su valor terapéutico y la ingenua osadía con que procedieron a evaluarlos. Citaremos un par de ejemplos. El primero el del ácido salicílico aislado en 1853 el químico francés Charles Frederic Gerhardt y acetilado para formar la aspirina en 1897 por el químico alemán Felix Hoffmann trabajando para la empresa Bayer, quien lo administra a su padre que sufría de fuertes dolores de artritis, los resultados fueron excelentes y sigue siendo utilizada desde entonces.

El segundo ejemplo es el ácido barbitúrico sintetizado en 1894 por Adolf von Bayer. En 1903 dos químicos de la Compañía Bayer, Emil Fischer y Joseph von Mering, descubrieron que el barbital era muy eficaz para dormir a su perro de compañía y sin duda experimentado por ellos mismos, ya que tanto Fischer como Mering, murieron siendo adictos a dicho barbitúrico. El empleo del fenobarbital como anticonvulsivante en las crisis epilépticas fue descubierto de modo casual por el médico alemán Alfred Hauptmann, cuando lo administró a los pacientes del hospital psiquiátrico de Friburgo para tranquilizarlos y dormirlos. A la mañana siguiente, observó que en aquellos internados por crisis epilépticas disminuían sus crisis y en muchos casos podían volver a una vida normal (Hauptmann 1912). Publica sus resultados en 1912, bajo el título: *Luminal bei epilepsie*. Se inicia con este descubrimiento una nueva era para el tratamiento exitoso de la epilepsia y el descubrimiento de múltiples familias de fármacos actuando sobre canales iónicos.

Los ejemplos anteriores nos permiten entrever que el *modus operandi* para los compuestos purinérgicos debió de ser similar, en sus inicios. El descubrimiento de la adenina fue muy temprano y lo realizó el químico alemán Albrecht Kossel en 1885. La presencia en sangre de la adenosina fue descrita en 1914. La primera descripción de su administración data de 1920, como era de esperar, en voluntarios humanos. La adenosina fue inyectada directamente en sangre y se descubre que tiene efectos cardiovasculares disminuyendo la presión sanguínea, aunque de modo fugaz. (Freund 1920).

En 1929, el mismo año que se publica la estructura del ATP, Drury y Szent-Györgyi realizan sus primeros estudios sobre las acciones fisiológicas de los nucleótidos de adenina, ATP, con especial énfasis sobre su efecto sobre el corazón humano, sin duda con voluntarios del propio laboratorio (Drury & Szent-Györgyi, 1929; Drury, 1936). Aunque los primeros resultados parecían satisfactorios, la falta de pureza de las preparaciones, la ausencia de análogos sintéticos estables y su rápido metabolismo extracelular, una vez inyectados en el torrente sanguíneo, frenaron los avances en el campo purinérgico. Experimentos similares, aplicando sistémicamente ATP, en la época inmediata a la finalización de la Segunda Guerra Mundial, se hicieron frecuentemente con ancianos voluntarios, sufriendo de problemas circulatorios y/o cardíacos, sobre todo en centros geriátricos. Eran otros tiempos... y nunca cualquier tiempo pasado fue mejor.

El desarrollo de modelos y preparaciones más simples y fáciles de manipular permitió, a partir de 1960, diferenciar las acciones debidas a la adenosina de las que correspondían al ATP y otros nucleótidos, gracias al empleo de la cafeína. Este antagonista natural de gran afinidad, pero baja especificidad, de todos los receptores de adenosina, fue la herramienta poderosa para comenzar la historia divergente de los receptores de ATP a partir de 1963 (Berne 1963; Fredholm 2003,

Fredholm et al. 2005). Sin olvidarnos de que la cafeína es la droga psicoactiva más consumida en el mundo y que el comercio del café es el segundo más importante mundialmente después del petróleo.

1.4. La neurogénesis del adulto sus primeros balbucesos.

Comprender como se forma el cerebro durante el desarrollo embrionario, necesita responder a muchas preguntas, entre ellas: como se diferencian los diversos tipos de células, cuales son los genes de la familia de los homeoboxes que se requieren en cada caso y que factores guían su migración hasta las posiciones específicas del cerebro adulto. En todas ellas se han producido significativos avances, pero siempre generando nuevas preguntas dada la complejidad del sistema nervioso adulto, sobre todo en los mamíferos.

Importancia excepcional en la arquitectura cerebral y cerebelosa es el ejercido por la glía radial durante el desarrollo. Estas células tapizan la corteza de las estructuras primigenias, son de naturaleza bipolar, se comportan como progenitoras y además forman el andamiaje que dirige la migración hacia el interior de las estructuras cerebrales. Los estudios histológicos de Cajal de gran precisión y finura, indican de modo preciso que las células de la glía radial se parecen más a la glía que a las neuronas (Ramón y Cajal, 1897; 1913-a; 1913-b). Actualmente se caracterizan con el marcador típico de glía, que es la GFAP, que son las siglas en inglés de la proteína ácida fibrilar de glía, siendo fácilmente identificables mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo fluorescente específico.

Uno de los investigadores que más aportaciones ha hecho al conocimiento de la glía radial es Magdalena Götz, en su laboratorio se identificaron los marcadores que la situaban a medio camino entre glía y neuronas, y la tecnología por “cell sorting” que 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 (Malatesta et al. 2003; Götz, 2003; Götz et al, 1998, 2015).

Recientemente con mi grupo de investigación hemos puesto de manifiesto la presencia y abundancia de transportadores vesiculares de nucleótidos, VNUT, en la glía radial del cerebelo, previa al desarrollo de las neuronas granulares. Volveremos sobre este aspecto en epígrafes posteriores (Menéndez-Méndez, Tesis doctoral, 2017, Menéndez-Méndez et al 2017).

La gran cuestión es si en el cerebro del adulto los precursores neurogliales se comportan del mismo modo y necesitan la activación de los mismos factores transcripcionales que el cerebro en desarrollo. ¿En qué situaciones se inicia el proceso de neurogénesis? ¿Qué necesita para desencadenarse? ¿Por qué, cuándo, dónde, cómo y para qué es necesaria la neurogénesis en el adulto?

El freno a la investigación sobre neurogénesis del adulto tiene sus raíces en una referencia parcial de un texto de Cajal, del cual dejé constancia en el discurso de apertura de la Real Academia Nacional de Farmacia de 2017 (Miras-Portugal, 2017).

“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 desarrollado 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.”

Ramón y Cajal era un gran científico, y jamás dejaría cerrada una vía por difícil, o casi imposible que le pareciera, confiaba en la valía y el esfuerzo de los cerebros jóvenes que en tiempo futuro tendrían sus mismas ambiciones y sueños, 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-c).
Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso.

Así pues el escrito en que se basaba el dogma era solo parte de un texto mucho más esperanzador y casi visionario. Todo un ejemplo y una lección de nuestro gran científico. Con la coletilla añadida de la escasa lectura completa de sus textos...

Como hemos ya mencionado en párrafos anteriores, el trabajo de Altman de 1965, sobre la neurogénesis en ratas jóvenes, pasó totalmente desapercibido. Unos 25 años más tarde Álvarez-Buylla y su grupo demostraron que existía una migración radial de neuronas jóvenes en la zona ventricular del cerebro de las aves adultas (Alvarez-Buylla and Nottebohm 1988; Alvarez-Buylla et al 1990).

Posteriormente, utilizando como modelo el canario, que es un pájaro cantor, demostraron que estaba relacionado con el aprendizaje del canto en la época del apareamiento y dependía de los niveles de testosterona (Alvarez-Buylla and Kirn 1997). Para excluir que fuera un proceso exclusivo de las aves, realiza experimentos similares en pequeños mamíferos y confirma plenamente la existencia de nichos neurogénicos en el cerebro adulto el artículo publicado en PNAS en el año 1993 llevaba por título: *“Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia”* (Lois and Álvarez-Buylla 1993). Este título en sí mismo es actualmente un dogma.

Lo importante, además, es que los primeros trabajos confirman que en los nichos neurogénicos se generan neuronas y glía y que por el camino desde la zona subventricular se van diferenciando en 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. Un poco intrigante es el hecho de que 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 (Lois and Alvarez-Buylla 1994; Lois et al. 1996).

¿Cómo se guían los axones, cuales son los mecanismos? Veremos que algunos de estos aspectos tienen respuesta en el sistema purinérgico, sobre todo en los receptores de nucleótidos y en sus enzimas de degradación (Díaz-Hernández et al. 2008; Sebastian-Serrano et al. 2016; Miras-Portugal et al. 2017).

Otro de los dogmas en neurociencia era el considerar a las células de glía como productos neurales de diferenciación especializada y como células soporte con un origen muy diferente del de las neuronas. Actualmente, aceptamos que la glía radial puede originar neuronas mediante división asimétrica, y que subpoblaciones específicas de astrocitos pueden funcionar como progenitores primarios de células madre neurales (Kriegstein y Alvarez-Buylla (2009). Esto indica que el sistema nervioso posee una gran capacidad para originar una extraordinaria diversidad celular, pero desconocemos los mecanismos requeridos para su activación.

2. ASPECTOS GENERALES DE LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y LA RAZÓN DE SU COMPLEJIDAD.

Cuando analizamos los distintos tipos de compuestos que actúan como neurotransmisores o como hormonas, acostumbramos a pensar que se liberan de modo controlado, actúan sobre uno o un pequeño grupo de receptores, son posteriormente eliminados mediante transporte directo altamente específico, o degradados de modo sencillo por un enzima hidrolítico. Hasta hace poco tiempo se les estudiaba como entes aislados y casi sin hablarse con otros sistemas de señalización. Nada más alejado de la realidad y los nucleótidos son un buen ejemplo de ello.

La señalización y neurotransmisión purinérgica se desarrolla en un espacio temporal mucho más complejo. Veamos un panorama de la situación:

Todos los aspectos que veremos a continuación han sido objeto de excelentes revisiones, en donde se constata la impronta del Profesor Geoffrey Burnstock y que pueden aportar una visión completa de un área tan compleja (ver revisiones Burnstock 2006a; 2006b; 2007; 2008; 2015; 2016; 2017a; 2017b).

1. El ATP es almacenado en vesículas de secreción por el transportador, VNUT, que es muy promiscuo, es decir, que transporta todos los nucleótidos presentes en el citosol celular, ya sean nucleótidos de purina o de pirimidina, trifosfato, difosfato o monofosfato, incluso sin grandes cambios en la afinidad.

2. En las mismas vesículas existe un segundo neurotransmisor o neurohormona co-almacenado, Los más frecuentes son la acetilcolina, catecolaminas, serotonina, e incluso generalmente con péptidos, etc... Todos ellos van a ser liberados conjuntamente al espacio extra-

celular o intersináptico, mediante exocitosis regulada. De la salida conjunta de lo almacenado en la vesícula, y la presencia de receptores para los varios compuestos almacenados, Burnstock acuñó el término de co-transmisión.

3. Fuera de la célula los nucleótidos actúan sobre los receptores P2 (purinérgicos, pirimidinérgicos). De los que existen dos grandes familias: La de los metabotrópicos P2Y acoplados a proteínas G y la familia de los ionotrópicos P2X, son canales operados por ligando, que al unirse el agonista despolarizan la membrana ya que permiten el paso de iones, en este caso cationes, permeando el calcio mejor que el sodio.

4. Los nucleótidos extracelulares son rápidamente degradados por enzimas asociadas a las membranas plasmáticas, con el centro catalítico hacia el espacio extracelular, finalizando de este modo su posible acción como agonistas de los receptores P2. Estas enzimas se denominan ecto-nucleotidasas son capaces de hidrolizar los enlaces fosfato de todos y cada uno de los nucleótidos, algunas con alta especificidad por uno de los nucleótidos trifosfato, difosfato o monofosfato. Otras que pueden defosforilar todos los nucleótidos, e incluso las fosfoproteínas extracelulares. Son al menos seis familias de ecto-enzimas, algunas de ellas con varios subtipos, con localización espacio temporal diferente. El producto final más abundante es la adenosina, sin olvidar que los nucleótidos de guanina, inosina o pirimidinas también originan sus correspondientes nucleósidos.

5. Me extenderé un poco más en este apartado, pues no será posteriormente desarrollado. La adenosina es el último metabolito extracelular, y tienen sus propios receptores antes denominados P1, pero hoy día como familia de receptores tipo A, que consta de 4 subtipos, todos metabotrópicos, A1, A2a, A2b y A3. Generalmente acoplados a la adenilato ciclasa, para los A1 y A3 con efecto inhibi-

dor 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).

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 cardiaca y sus ventajas por los menores efectos secundarios, abrió nuevas expectativas a la farmacología de la adenosina y sus derivados (Buhr, 2008; Thompson 2008; Müller and Jacobson 2011). Igualmente la existencia de receptores de adenosina como receptores homodiméricos y heterodiméricos con los de dopamina, incrementó el interés de las grandes compañías farmacéuticas por esta nueva farmacología. En este caso los antagonistas del receptor A2a, formando receptores diméricos ofrecen nuevas perspectivas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Jenner 2014) y en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Cunha 2016).

Finalmente la adenosina es eliminada de la sangre mediante transportadores de membrana que son de muy diversa naturaleza, ya que en algunas células están acoplados al gradiente de sodio y en otros casos a un transporte equilibrativo. Tienen diversas afinidades por los distintos transportadores de nucleótidos purínicos o pirimidínicos e incluso las bases correspondientes y análogos, por lo que son dianas muy relevantes en el tratamiento del cáncer y como antivíricos (Cano-Soldado and Pastor-Anglada 2012; Molina-Arcas et al. 2009).

Procederemos a analizar sucintamente estos apartados, para ponerlos posteriormente en el contexto de los modelos de estudio que han permitido una aproximación a los diferentes aspectos de la neurogénesis, neuroprotección y reparación del sistema nervioso.

2.1. Almacenamiento vesicular de los nucleótidos y su liberación

El primer apartado como hemos mencionado estará dedicado al almacenamiento del ATP y nucleótidos en general. Antes de entrar en materia es necesario resaltar que el transportador vesicular está causando una auténtica revolución en la señalización purinérgica y en un reciente trabajo, Moriyama, quien identificó el gen de VNUT en 2008, reivindicaba ese papel en el 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).

Una gran variedad de nucleótidos son almacenados en vesículas de secreción por el transportador, VNUT. Tiene poca selectividad por sus sustratos, ya que es promiscuo, transporta todos los nucleótidos presentes en el citosol celular, ya sean nucleótidos de purina o de pirimidina, trifosfato, difosfato o monofosfato, incluidos los diadenosina polifosfatos (ApnA) compuestos descubiertos por nuestro grupo en el año 1988 y que pueden ser considerados neurotransmisores o señalizadores a todos los efectos (Rodríguez del Castillo et al. 1988). En estudios clásicos de transporte con gránulos cromafines de la medula adrenal observamos y describimos esa escasa selectividad por el sustrato. Un detallado estudio con análogos de nucleótidos fluorescentes, los eteno derivados de los nucleótidos de adenina, nos permitió demostrar que el mecanismo del transporte poseía una cinética *mnemónica*, que se caracteriza por transiciones lentas de las hélices de la proteína dentro de la bicapa lipídica, lo que permitía el reconocimiento de otras estructuras nucleotídicas similares. Hasta aquel momento ese tipo de cinética solamente había sido descrita en los enzimas. Las características cinéticas han sido corroboradas en gránulos cromafines, vesículas sinápticas del cerebro, e incluso con estudios en citometría de flujo mediante nucleótidos fluorescentes de-

rivados del ATP, como es el caso del eteno –ATP, ϵ -ATP (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*), 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^+ (NPT1, NPT3, NPT4 y homólogo NPT) se incluyen también dentro de esta familia (Anne and Gasnier 2014).

El transportador vesicular de nucleótidos fue el último de los transportadores vesiculares en ser clonado (Sawada et al. 2008) y se consiguió tras la exploración de las bases de datos del genoma humano, identificándolo como un nuevo gen de la familia SLC17. El gen, *SLC17A9*, codifica una proteína de 430 aminoácidos con 12 hélices transmembrana. El análisis por *Northern blot* reveló que el gen *SLC17A9* se expresa en varios órganos pero es especialmente abundante en el cerebro, la glándula adrenal y la glándula tiroidea. Además, en la glándula adrenal, la proteína SLC17A9 es expresada específicamente en la médula y está asociada con los gránulos cromafines, como se reveló por ensayos de inmunohistoquímica, microscopía inmunoelectrónica y *Western blot*. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que *SLC17A9* codifica el transportador de nucleótidos

de los gránulos (Sawada et al.2008).Los requerimientos para el transporte son la necesidad de una ATPasa vesicular que genera un gradiente electroquímico de protones y carga y la presencia del ion Cl^- .

Se ha descrito que los cuerpos cetónicos, como el acetoacetato, compiten con el Cl^- en el lugar de reconocimiento en transportadores vesiculares y, por tanto, inhiben reversiblemente el transporte del neurotransmisor. Esta inhibición por acetoacetato fue demostrada por primera vez con los transportadores de glutamato, pero una inhibición similar se observa también en otros miembros de la familia SLC17, como el VNUT lo que plantea la posibilidad de que la neurotransmisión purinérgica pueda ser también controlada por los cuerpos cetónicos, lo que aportaría un dato relevante para comprender la diabetes no controlada. El efecto inhibitorio del acetoacetato sobre el VNUT se previene completamente por la incubación con una elevada concentración (100 mM) de Cl^- . El glioxilato, un metabolito de la glicina, se ha descrito recientemente como un inhibidor selectivo de VNUT, lo que también ayudaría a comprender el efecto toxico 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^- . 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 neuropatico (Hiasa et al. 2014; Kato et al. 2017; Moriyama and Nomura, 2018).

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).

El VNUT humano también puede ser procesado de modo alternativo, y es en la región amino terminal donde se ha descubierto. Existen pues dos posibilidades de la proteína de VNUT una de 436 y otra de 430 aminoácidos. Se desconoce si esto implica una localización específica en el tejido, o en los orgánulos subcelulares. (Sesma et al. 2013)

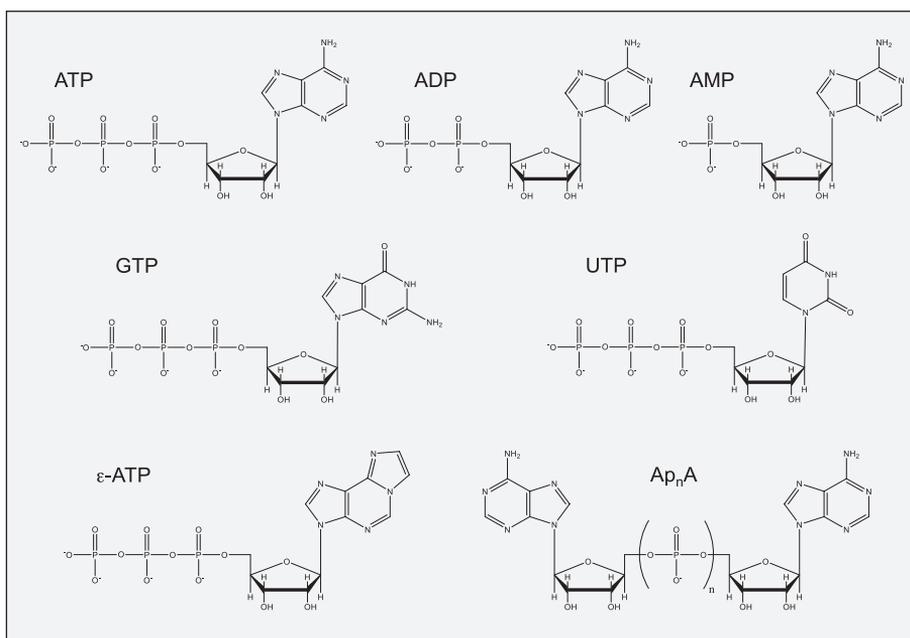


Figura 1. Estructura de los principales sustratos utilizados en la caracterización del transportador vesicular de nucleótidos (J. Gualix 2017).

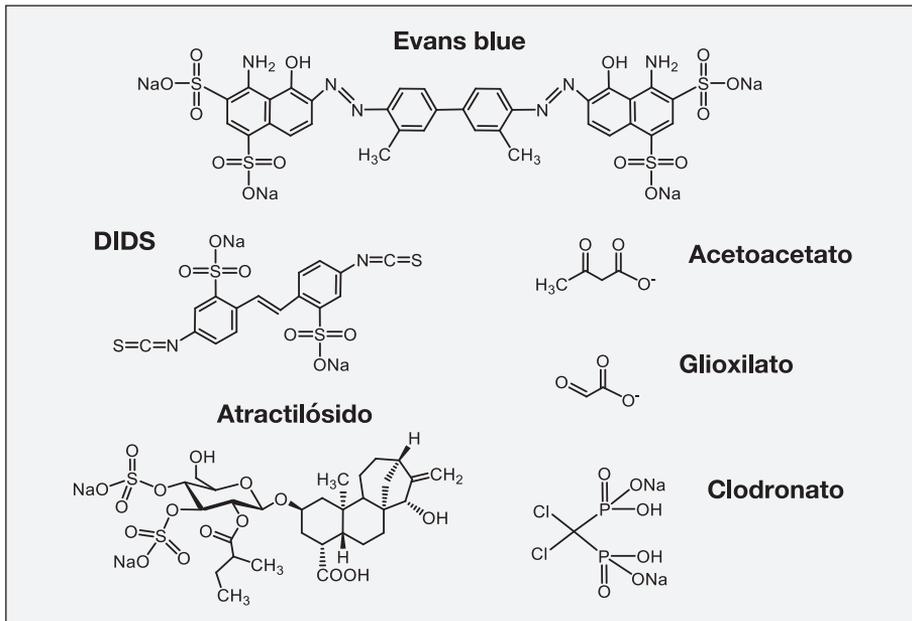


Figura 2. Estructura de los principales inhibidores del transportador vesicular de nucleótidos (J. Gualix 2017).

2.2. Presencia de VNUT en tejidos neurales: su relación con el desarrollo del cerebelo.

En el sistema nervioso central del individuo adulto, en este caso ratones, la distribución de VNUT es bastante amplia, pero dista mucho de ser homogénea. Destacan con localizaciones bien definidas la zona del hipocampo, el bulbo olfativo y el cerebelo. La maduración postnatal del cerebelo, ya descrita por Cajal, es de especial relevancia para estudiar la evolución de la distribución de los componentes celulares y moleculares en cada una de sus estructuras. Además en estas etapas tempranas desde el día 1 postnatal, P1, hasta el P5 o el P7 se pueden cultivar las neuronas, siendo las granulares las que más éxito han tenido como modelo de cultivos neurales primarios. Las granulares han sido de gran utilidad para la caracterización de los receptores de nucleótidos P2, con gran diversidad tanto de los P2X, como P2Y. Han sido igualmente un modelo muy valioso para descubrir las cascadas de señalización acopladas, donde nuestro grupo ha hecho aportes muy significativos (Hervás et al, 2003; 2005; Ortega et al., 2008; 2009; 2010; 2011; Morente et al. 2014; Pérez-Sen et al. 2017).

En células de línea tumoral neuroblastoma, N2a, transfectadas con el transportador VNUT, demostramos su implicación en la neurogénesis necesaria para la diferenciación neural y la elongación de las prolongaciones axónicas. (Menendez-Mendez et al. 2015; 2017)) En fecha reciente hemos puesto de manifiesto el importante papel del transportador de nucleótidos (VNUT) en las células granulares aisladas del cerebelo de ratón en el día postnatal 5, en donde es funcional desde el primer momento del cultivo y disminuye con el tiempo, en contraposición con el transportador vesicular de glutamato que aparece más tardíamente y se incrementa de modo notable (Menendez-Mendez et al., 2015; 2017). La funcionalidad del VNUT fue medida mediante liberación de ATP por la acción de los ionóforos

de calcio, que son esenciales para la liberación exocitótica. La técnica empleada fue la de medida de luminiscencia mediante luciferin /luciferasa. La liberación de ATP se redujo drásticamente al añadir al cultivo los inhibidores del transportador, el Evans blue y el clodronato.

La naturaleza glutamatérgica de las neuronas granulares cerebelosas, permite medir la liberación del glutamato por estímulos que despolarizan la membrana plasmática. La abundante presencia de receptores inotrópicos de nucleótidos, los P2X3 y P2X7, son capaces de inducir la liberación de glutamato, demostrando que son funcionales (Leon et al., 2006; 2007; 2008). También estos mismos receptores pueden inducir la propia liberación del ATP vesicular y para demostrarlo es necesario utilizar la técnica de vertido de las vesículas cargadas con quinacrina y su apagamiento al fusionarse con la membrana plasmática (Sanchez-Nogueiro et al. 2009; Gutierrez-Martin et al. 2011).

Un hecho peculiar radica en la distribución subcelular del VNUT dentro de la célula nerviosa, que se localiza en vesículas tanto en zona pre- como post-sináptica, mientras que el transportador vesicular de glutamato se localiza de modo altamente preferencial en la zona presináptica. Otro aspecto singular, pero trascendente, es la presencia del VNUT en estructuras subcelulares colocalizando con el marcador lisosomal LAMP-1. La cuestión es que actualmente se considera la actividad lisosomal y de autofagia, como una etapa necesaria para la diferenciación y evolución de los progenitores neurales, lo que estaría de acuerdo con su función en la neurogénesis.

En los cultivos de células granulares, obtenidas de una etapa postnatal temprana, están presentes en los primeros días (entre los días 1 y 4 in vitro) células progenitoras no diferenciadas. En el cerebelo en su conjunto tenemos una evolución similar, siendo el VNUT

muy abundante en etapas embrionarias y los primeros días postnatales, cuando el cerebelo no está plenamente desarrollado.

La presencia de VNUT en células progenitoras se demuestra mediante doble marcaje con inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti-VNUT y los diferentes marcadores de las células progenitoras. Uno de los más utilizados es la nestina. Por otra parte el marcaje nestina positivo desaparece gradualmente conforme madura el cultivo, ya que es necesario incluir un anti mitótico que es el AraC, para evitar la proliferación de los astrocitos y microglia. Estos resultados sugieren que el VNUT puede estar presente en las etapas más tempranas de desarrollo del cerebelo. Para confirmar esta posibilidad, se realizaron cortes del cerebelo de ratones fetales, e inmaduros post-natales y se realizaron los estudios de colocalización del VNUT con los diversos marcadores de células madre y linajes celulares ya comprometidos mediante inmunofluorescencia (Menendez-Mendez et al. 2017).

Los resultados en cortes de cerebelo confirmaron plenamente la evolución de la expresión del VNUT desde la etapa inmadura

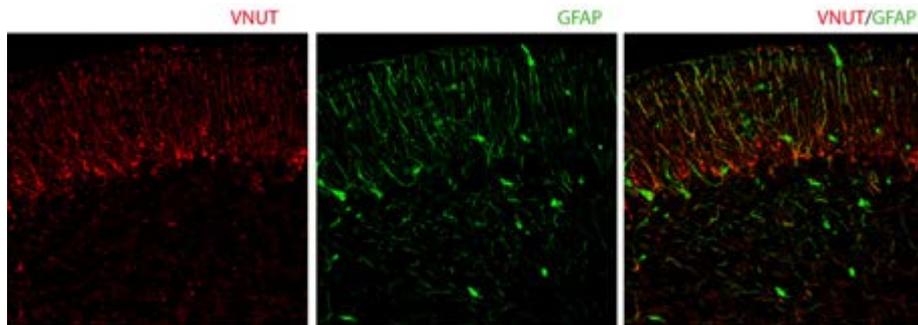


Figura 3. Localización del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, y de la proteína fibrilar ácida de glía, GFAP, en el córtex del cerebelo de ratón. Micrografía de microscopía confocal representativa de una sección del cerebelo en el día 15 postnatal, inmunolocalización en rojo para el VNUT, panel izquierdo; en verde para la GFAP, panel central y superposición de ambos marcajes en el panel derecho. (Micrografía obtenida por la Dra. Aida Menéndez-Méndez)

post-natal P5 hasta el P15 (Figura 3). Al comienzo las capas de la arquitectura cerebelosa no están bien definidas y las células granulares están todavía migrando de la capa externa a la interna. Por ello es un buen modelo para correlacionar la expresión del VNUT con la de otros factores específicos de diferenciación de células progenitoras, como son el Math 1 y el DCX. El factor Math 1 es un gen esencial que especifica el linaje de las neuronas granulares cerebelosas, y se expresa en las células que ya están comprometidas en su programación, GCPs, para convertirse en neuronas granulares (Ben-Arie et al., 1997; Srivastava et al., 2013). El marcador de doble cortina, DCX, es una proteína asociada a los microtúbulos que sirve para identificar los precursores neurales y las neuronas inmaduras (Brown et al., 2003).

En la fase temprana postnatal P5, El VNUT se expresa abundantemente y colocalizado con ambos marcadores, el Math 1 y el DCX, lo que sugiere que se expresa en las neuronas inmaduras que están migrando desde la capa externa hasta la capa granular interna del cerebelo. En los días siguientes hasta P15 se produce un decaimiento paulatino de los marcadores, Math 1 desaparece y DCX se reduce dramáticamente. Los niveles de VNUT se mantienen en la capa granular y molecular del cerebelo en el adulto (Figura 4).

La glía de Bergman, que es la organizadora de la migración radial de las neuronas en el desarrollo también expresa VNUT, habiendo sido propuestas como posibles células progenitoras remanentes del desarrollo embrionario y fetal (Herndon 1964). En recientes experimentos en nuestro laboratorio hemos observado que los cultivos de cerebelo de ratón adulto originan neuroesferas, de las cuales se originan células de naturaleza glial y neural. Esta es una primera demostración de que en ratón además del giro dentado del hipocampo y de la zona subventricular, existe otra zona neurogénica, que podría participar en la regeneración del cerebelo (manuscrito en preparación).

2.3. Los receptores de nucleótidos, familias P2X y P2Y, generalidades.

Los receptores de nucleótidos o receptores P2, se dividen en dos grandes familias de acuerdo a su estructura molecular y a los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y. Mientras que los primeros son canales iónicos activados por ligando, los segundos son receptores acoplados a proteínas G (Abbracchio & Burnstock 1994, Burnstock 2007b, Coddou *et al.* 2011, von Kugelgen & Harden 2011). En mamíferos se han clonado y caracterizado las propiedades farmacológicas de las distintas subunidades de los receptores P2X y P2Y (Burnstock 2007b, Burnstock 2011, Burnstock 2013). La nomenclatura utilizada para designar los diferentes subtipos de receptores, sigue las directrices recomendadas por el Comité de Nomenclatura de receptores y clasificación de fármacos de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge *et al.* 2009, Coddou *et al.* 2011). No obstante, nuevos subtipos de receptores po-

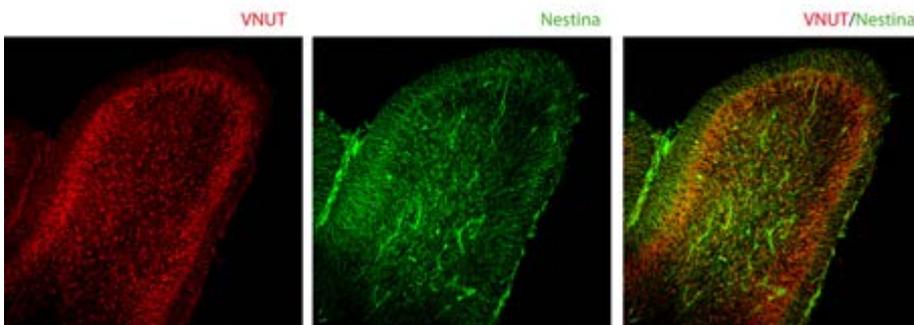


Figura 4. Localización del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, y de la proteína marcadora de progenitores neurales, Nestina, en el córtex del cerebelo de ratón. Micrografía de microscopía confocal representativa de una sección del cerebelo en el día 3 postnatal, inmunolocalización en rojo para el VNUT, panel izquierdo; en verde para la Nestina, panel central y superposición de ambos marcajes en el panel derecho. La presencia de Nestina indica que en esa fecha el cerebelo es plenamente inmaduro y los progenitores neurales están todavía presentes. (Micrografía obtenida por la Dra. Aida Menéndez-Méndez)

drían agregarse a esta clasificación, puesto que su identificación y caracterización farmacológica no resulta sencilla. Ello se debe a que no existen agonistas y antagonistas que sean altamente específicos y que permitan una clara diferenciación en el tipo de respuesta obtenida, produciéndose un solapamiento de la misma en aquellos sistemas que coexpresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes, pueden degradar o transformar los compuestos utilizados, falseando el resultado obtenido. Por esta razón, no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca entre los receptores identificados en los tejidos nativos y algunos de los receptores P2 clonados. Por ello, en muchos casos se utiliza el sufijo anglosajón *-like* para calificar a los receptores endógenos, hasta que posteriormente se apliquen criterios que corroboren su identificación.

2.3.1. Receptores metabotrópicos P2Y

Los receptores metabotrópicos P2Y son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, cuyo efecto es mediado intracelularmente por la acción de segundos mensajeros, presentando por ello una respuesta lenta tras la unión de su ligando. Su estructura consta de siete hélices transmembrana hidrofóbicas conectadas por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, quedando sus extremos amino y carboxilo terminal en el lado extra- e intracelular respectivamente. La tercera, sexta y séptima hélices transmembrana han sido identificadas como potenciales sitios de unión de sus agonistas. Su tamaño molecular varía entre 41 y 53 KDa antes de ser glicosilados y el número de aminoácidos oscila entre 328-377 aminoácidos (Burnstock 2017).

Hasta ahora en humanos y mamíferos, han sido clonados y caracterizados ocho miembros de la familia P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Abbracchio *et al.* 2006, Burnstock 2007b). A su vez, estos receptores se dividen en tres grupos en función de su afinidad por los nucleótidos de adenina y/o uridina. El primero contiene los receptores P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, los cuales son activados por nucleótidos de adenina como el ADP, siendo el P2Y₁₁ el único que responde a ATP. El segundo lo integran los receptores P2Y₂ y P2Y₄, los cuales son activados por los nucleótidos de adenina y de uracilo. El último grupo está constituido únicamente por el receptor P2Y₆, que es específico para las pirimidinas. Un caso especial es el del receptor P2Y₁₄, que se activa por UDP-glucosa u otros azúcares activos (Abbracchio *et al.* 2006, von Kugelgen 2006, Burnstock 2007b, von Kugelgen & Harden 2011, Weisman *et al.* 2012). Además de los receptores identificados hasta la fecha, pueden existir otros subtipos P2Y (von Kugelgen 2006) como el GPR17, que se describió primero como un receptor de cisteil-leucotrienos y posteriormente se observó que también respondía a UDP. El grupo de

la Dra. Maria Pía Abbracchio ha demostrado su importancia en la diferenciación a oligodendrocitos y reparación en el sistema nervioso (Ciana *et al.* 2006 ; Fumagalli *et al.* 2017).

Los receptores P2Y, cuya expresión es ubicua, regulan o modulan diversas funciones fisiológicas (Fischer & Krugel 2007). En el SNC en particular, participa en fenómenos de plasticidad sináptica, liberación de neurotransmisores y en la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración. Como es habitual en este tipo de receptores, su señalización está acoplada a proteínas de membrana como la fosfolipasa C (PLC) y la adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G. Por otra parte, estos receptores de forma constitutiva o bajo determinadas circunstancias forman homo- o heterodímeros, dicha agregación podría ser esencial para su correcto tráfico desde el retículo endoplasmático rugoso y las cisternas del Golgi, hasta su expresión en la membrana plasmática.

2.3.1.1 Importancia de los Receptores P2Y12 y P2Y13

La familia de receptores metabotrópico sensibles a ADP cuenta además con el P2Y12, que es sin duda el receptor más importante desde el punto de vista farmacológico. Fue identificado por el grupo de David Julius en California, que lo clonó de células derivadas de la médula ósea y posteriormente lo identificó en plaquetas sanguíneas, en donde se estableció que era necesario para cambiar la morfología de las plaquetas y ayudar a formar el trombo plaquetario. Está acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa, a través de una proteína Gi (Hollopeter et al. 2001). Al mismo tiempo que se describía su presencia y función, se descubrió la primera enfermedad hereditaria asociada a un receptor purinérgico, la de un paciente con defecto en la coagulación sanguínea. Esto facilitó el desarrollo de una amplia farmacología de agentes anti agregantes para tratar las enfermedades cardiovasculares. El clopidogrel siendo el primero de la larga serie desarrollado por la industria farmacéutica y recetado para evitar el ictus cerebral. La existencia de polimorfismos genéticos también es tenida en cuenta actualmente para evaluar la resistencia a la administración del clopidogrel (Cui et al. 2017).

El clopidogrel, conocido comercialmente como Plavix supuso todo un reto a la química médica y la farmacocinética, ya que es un profármaco, que necesita metabolizarse en el hígado y después, ya como metabolito activo, se une al receptor P2Y12 plaquetario de modo irreversible. La vida media del metabolito activo es muy corta y con estabilidad limitada, por lo que no se ha empleado como fármaco, pero si ha sido útil como radioligando para identificar poblaciones celulares expresando el receptor. Debido a esas complicaciones y a su importancia en clínica, como antitrombótico, se desarrollaron otros muchos compuestos de diversa naturaleza. Entre los nuevos compuestos, el que más se usa actualmente es el Ticagrelor que es el primer antagonista competitivo del P2Y12 y ampliamente usado como fármaco (Jacobson and Müller 2016).

El P2Y₁₂ fue el primer receptor de la familia P2Y en ser cristalizado y su estructura tridimensional resuelta por difracción con rayos-X. La estructura tridimensional se obtuvo, tanto en presencia de agonista, como de antagonista. El agonista empleado se corresponde con el de máxima actividad, agonista total, 2MeSATP, y se empleó con una muestra de proteína reconstituida en fase cubica lipídica, LCP. De modo similar se realizó el estudio en presencia de un antagonista con actividad antitrombótica, que es el diadenosina tetrafosfato, Ap₄A, compuesto natural contenido en las vesículas de secreción y cuya presencia en gránulos cromafines fue descubierta en nuestro laboratorio (Rodríguez del Castillo et al., 1988).

El conocimiento en profundidad de la estructura espacial del receptor P2Y₁₂, ha permitido establecer analogías con otros receptores y es un gran avance en el desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas de los receptores de la familia P2Y. La estructura del receptor en presencia de agonista, o de antagonista cambia drásticamente su configuración en reposo, en ausencia de los efectores, sobre todo en la parte del receptor expuesta al medio extracelular (Zhang et al. 2014a; 2014b).

Para nuestro grupo tiene especial relevancia el receptor P2Y₁₃ ya que hemos descubierto que controlan cascadas que regulan los procesos de defosforilación, para volver al estado de partida y que la célula sea sensible a una nueva señalización por nucleótidos. Estas funciones son realizadas por las familias de fosfatasas, siendo las fosfatasas duales, DUSP, que pueden defosforilar ambos tipos de enlaces fosfato, los unidos a fosfotirosinas y los unidos a los grupos alcohol de la fosfoserina y fosfotreonina. Entre los receptores más importantes en este tipo de señalización y control está el P2Y₁₃, que protege de este modo del estrés genotóxico, inducido por el tratamiento con Cis-platino, al aumentar la expresión de la fosfatasa dual, DUSP2, lo

que permite la recuperación de la cascada de las MAP quinasas vía P38 (Morente et al., 2014; Pérez-Sen et al 2016; 2017; Miras-Portugal et al. 2016).

El receptor P2Y13 carece por el momento de agonistas o antagonistas altamente selectivos, siendo dependiente de la farmacología desarrollada para el P2Y12. Actualmente se considera como antagonista selectivo al Díazo derivado del pyridoxal fosfato, PSB-0739, y al ticagrelor en preparaciones donde la presencia del P2Y12 esté ausente. El conocimiento de la estructura espacial del receptor P2Y12, está sirviendo de molde en química médica para desarrollar mejores agonistas y antagonistas del P2Y13 (Jacobson and Müller 2016).

Es importante destacar que el cromosoma 3 humano, contiene en su brazo largo, en una región muy reducida y de modo consecutivo, los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14, lo que explica su homología de secuencia y su posible origen por duplicación y amplificación (Pérez-Sen et al. 2017).

2.3.2. Receptores ionotrópicos P2X

Los receptores ionotrópicos P2X son canales iónicos, operados por ligando, insertados en la membrana plasmática, que se activan por la acción del agonista, que mayoritariamente suele ser el ATP. La unión del agonista permite el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), siendo la permeación para Ca^{2+} más elevada que para Na^+ (North 2002, Khakh & North 2012). Hasta la fecha, se han clonado y caracterizado siete subunidades P2X distintas, desde P2X1 a P2X7, que se ensamblan como homo- o heterotrímeros.

Los receptores P2X presentan unas características estructurales que les hacen ser una familia bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North 1996). Parecen muy simples, ya que cada subunidad tiene solamente dos hélices transmembrana (TM), cuyos extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el lado intracelular, y el dominio extracelular es de gran tamaño y múltiples enlaces por puentes disulfuro para mantener la estructura. Estas subunidades P2X varían desde los 379 aminoácidos del receptor P2X6 hasta los 595 del P2X7. La apertura del canal requiere que el agonista se una a la zona específica entre las subunidades de los receptores P2X, este modo de apertura es común a todos los receptores operados por ligando, desde los de Acetilcolina a los de GABA, que tienen los sitios de unión en las zonas donde interaccionan las subunidades que conforman el canal. Parece lógico, si queremos forzar una estructura a abrirse, que empleemos una molécula a modo de cuña que fuerce el cambio de estructura y en los lugares de interacción, ya que así actúan sobre las dos subunidades adyacentes.

2.3.2.1. Estructura de los Receptores ionotrópicos P2X

Mediante la microscopía de fuerza atómica, el grupo del Profesor Inoue, consiguió imágenes en donde se podían observar directamente los cambios conformacionales inducidos por el agonista, ATP, en un único receptor aislado, en este caso el homotrímero del receptor P2X₄. Se aprecia claramente que la acción del agonista obliga a abrirse los dominios extracelulares, replegándose “*como los pétalos de la flor de loto*”, es una metáfora muy poética, muy japonesa, pero también muy real y que da cuenta exacta de cómo se abre el receptor (Shinozaki et al. 2009).

La estructura exacta de los receptores P2X mediante difracción por rayos X la consiguió el grupo de Eric Gouaux, trabajando primero con el receptor P2X₄. Este investigador tenía una amplia experiencia en el estudio estructural de otros canales, algunos mucho más primitivos, como el sensor de ácidos bacteriano y los más complejos ionotrópicos de glutamato, los de AMPA y Kainato (Jin et al. 2003; Jasti et al. 2007).

Resulta lógico que su siguiente movimiento fuera interesarse por los receptores ionotrópicos de ATP, los P2X, aparentemente tan simples. Curiosamente su estructura resultó muy semejante a la de los receptores sensores de ácido, que se supone que son los más primitivos en la evolución de los receptores ionotrópicos (Gonzales et al, 2009; Bacongus et al., 2013).

Finalmente la estructura de los receptores P2X se resolvió empleando como modelo un homotrímero del P2X₄, al que se habían acortado los extremos amino y carboxilo intracelulares para más simplicidad. Las tres subunidades están asociadas en el espacio extracelular girándose en torsión lo que origina una estructura muy resistente. En un principio se pensaba que el ATP se unía a un sitio

del agonista ortostérico en la zona extracelular de las subunidades (Kawate et al., 2009; Gonzales et al., 2009). No obstante al conseguir resolver la estructura con el agonista, ATP, unido, la disposición de las subunidades en el espacio cambia de configuración y el lugar de unión del nucleótido se sitúa en la interfase de las subunidades. El receptor tiene tres sitios de unión equidistantes entre si 40 Å a nivel de la membrana plasmática y al unirse el ATP fuerza los dominios externos a desenrollarse y abrirse con “*una flor de loto*”. (Shinozaki et al. 2009; Hattori and Gouaux 2012), Tal como había predicho el equipo del Profesor Inoue, unos años antes (Shinozaki et al. 2009).

Un nuevo hito ha sido alcanzado con el receptor homotrímico del P2X₃ nativo. Este receptor es extraordinariamente importante ya que se sitúa en las terminales de las fibras sensitivas, junto con canales TRP, y es actualmente una poderosa diana para el tratamiento del dolor neuropático. El grupo de Eric Gouaux ha sido capaz de definir como ocurre el disparo del receptor con el agonista y la acción del antagonista (Mansoor et al. 2016). Es de esperar que permita sintetizar mejores agonistas, algunos nuevos nucleótidos y otros de naturaleza no nucleotídica, así como antagonistas eficaces y específicos, entre los que deberíamos de considerar los diadenosina tetra y penta fosfato, ApnA y los diinosina tetra y penta fosfato, IpnI (Pintor et al. 1995; 1996; 1998; 1999).

2.3.2.2. Agonistas y antagonistas de Receptores ionotrópicos P2X

Las herramientas farmacológicas disponibles para poder distinguir los distintos receptores P2X son muy limitadas, y en muchos casos los mismos agonistas y antagonistas pueden actuar tanto en los receptores P2X como en los P2Y. Siguiendo criterios estrictamente farmacológicos se pueden distinguir dos grupos dentro de los receptores P2X. El primero de ellos lo forman los receptores P2X1 y P2X3 de elevada afinidad por el ATP ($EC_{50} \approx 0,1\mu M$) y por su análogo sintético α,β -meATP. Estos receptores se desensibilizan rápidamente e inactivan en menos de 1 segundo de exposición al ATP, recuperándose de forma muy lenta. El segundo grupo, que engloba al resto de receptores (P2X2, 4, 5, 6 y 7), se caracteriza por una menor afinidad al ATP, insensibilidad al α,β -meATP (salvo el receptor P2X6) y una desensibilización menor, o totalmente ausente, como es el caso del receptor P2X7 (Coddou et al. 2011). La gran mayoría, sino todos, los agonistas son moléculas altamente cargadas, como corresponde a los nucleótidos, lo cual implica una escasa o nula biodisponibilidad oral. El sitio ortostérico de los receptores P2X está bien conservado entre los diferentes subtipos. Contiene cinco cargas positivas de los residuos de los aminoácidos, una arginina y cuatro lisinas, que interaccionan con la cadena del trifosfato. El ATP exhibe una potencia de micro molar en todos los subtipos, excepto en el P2X7, que requiere concentraciones del mM para ser activado (Miras-Portugal et al. 2003; Jacobson and Müller, 2016).

El desarrollo de ligandos alostéricos positivos para los receptores P2X se realizó imitando los ya conocidos para los receptores ionotrópicos de GABA. El primero descrito fue la Ivermectina, que es una lactona macrocíclica empleada en medicina veterinaria como antiparasitaria, que se une al receptor P2X4 favoreciendo la apertura del canal y retrasando el cierre del mismo. Este compuesto actúa además sobre muchos otros canales, como los de cloruro, abiertos

por glutamato que se encuentran en el musculo y células nerviosas de organismos primitivos parasitarios, entre ellos el gusano nematodo, *Onchocerca volvulus*, responsable de la oncocercosis, que causa la mitad de los casos de ceguera en el mundo (Omura and Crump, 2004). La campaña de prevención de la ceguera en África se está realizando administrando ivermectina a las poblaciones afectadas.

Los antagonistas de los receptores P2X, han sido ampliamente desarrollados, aunque los primeros utilizados no eran específicos, suramina, también conocida como germanina y empleado como antiparasitario en las colonias germanas de África, el Azul reactivo, PPADS etc. Actualmente se dispone de algunos altamente selectivos, como el derivado del ATP, el trinitrofenil ATP, TNP-ATP, que es muy potente sobre el P2X1 y P2X3. Mención especial de los diinosina polifosfatos, que son poderosísimos antagonistas de los receptores P2X1 y P2X3, con afinidades en el rango del nano molar muy bajo, que fueron sintetizados en nuestro laboratorio por Javier Gualix (Pintor et al.1997; King et al. 1999).

2.3.2.3. ¿Los diadenosina y diinosina polifosfatos cuál es su función sobre los receptores P2X?

Los diadenosina polifosfatos son compuestos naturales presentes en vesículas secretoras neurales y neuroendocrinas de diversa naturaleza. Fueron identificados por primera vez en los granulos cromafines junto con adrenalina y noradrenalina en nuestro laboratorio, el Ap4A y Ap5A eran los más abundantes (Rodríguez del Castillo et al. 1988). Estos compuestos eran liberados de modo dependiente de calcio, a partir de vesículas sinápticas, lo que indicaba que eran funcionales fuera de las células, también se podían cuantificar en el medio extracelular después de perfusión *in vivo* mediante la técnica de push-pull en el cerebro consciente (Pintor et al. 1992a; 1993; 1995 c). El siguiente ApnA descubierto fue el Ap6A (Pintor et al 1992b). Mucho más tarde estudiando la encefalopatía hepática, causada por hiperamónemia, estudiamos los perfundidos del cerebro de rata y además del Ap4A, en las muestras del micro dializado cerebral, pudimos medir el Ap3A (Gualix et al. 2014).

En un principio, propusimos a los diadenosina polifosfatos como agonistas de nuevos receptores ionotrópicos de nucleótidos, los receptores dinucleotídicos. En ese momento los P2X no habían sido estudiados, ni clonados. Actualmente ya plenamente caracterizados los P2X, sus características se corresponden con los P2X1 y P2X3 y con algún heterotrímero P2X2/P2X3. Sus altísimas afinidades para los receptores en terminales sinápticas de cerebro en ratones, cobayas y humanos, y la capacidad de modular la secreción de los transmisores clásicos, como GABA, Glutamato y Acetil-colina, así como las afinidades de los receptores de GABA_B en las terminales GABAérgicas del cerebro y los nicotínicos en las terminales colinérgicas, indicaban un papel muy relevante en la fisiología y fisiopatología del Sistema Nervioso, sobre todo teniendo en cuenta que la acción se efectúa a concentraciones de nano Molar bajo, e incluso de pico Mo-

lar (Pintor et al. 1997; 1999; Miras-Portugal et al. 1998; King et al. 1999; Gómez-Villafuertes et al. 2001; 2003; Gualix et al. 2003).

Años más tarde, Javier Gualix en nuestro laboratorio sintetizó los diinosina polifosfatos mediante una técnica enzimática, transformando el grupo amino de la adenosina en inosina. El enzima era una AMP desaminasa aislada de un hongo. Los Ip4I e Ip5I, obtenidos a partir del Ap4A y del Ap5A, son poderosísimos antagonistas de los receptores P2X1 y P2X3, con afinidades en el rango del nano molar muy bajo o pico molar, toda una proeza (Pintor et al. 1997; King et al. 1999). Actualmente se ha demostrado que son poderosos analgésicos *in situ* en el dolor neuropático (Artalejo et al. en preparación 2018)

2.3.2.4. Importancia de los inhibidores del Receptor P2X7

Haremos una mención especial a los inhibidores del receptor P2X7, ya que este receptor está implicado en procesos de neurogénesis, neuroprotección y diferenciación que serán objeto, más adelante, de apartados específicos, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Huntington, en epilepsia y en regeneración axonal. El primer antagonista muy empleado aunque no totalmente específico es el Brilliant Blue G, o Azul Brillante G, por sus siglas BBG. Se trata de un colorante alimentario aceptado por la FDA desde hace un siglo, cuya afinidad por el P2X7 es mil veces superior que la que presenta por el P2X4 en el modelo experimental de la rata (Jiang et al., 2000).

Como anécdota destacar que el BBG, se utiliza en todo tipo de caramelos, piruletas bebidas isotónicas, merengues y tartas azules, además de algunas mermeladas. En ratoncillos blancos a los que se administra en gran cantidad aparecen coloreados el pelo, los bigotes sensoriales, las patitas y las orejas. A este ratoncillo le han denominado el ratón pitufo.

En trabajos de nuestro laboratorio el antagonista BBG, que puede ser administrado por vía intraperitoneal, ha resultado eficaz en la mejora de enfermedades hereditarias neurodegenerativas, como el Huntington y Alzheimer, en las cuales aparece una sobreexpresión e incremento de la actividad de los propios receptores P2X7. En el caso de la enfermedad de Huntington, su administración atenúa los síntomas, mejorando los temblores y aumentando el peso del ratón transgénico que expresa la huntingtina mutada, con gran número de residuos de glutamina, una poly-Q, de un modo condicional (Díaz-Hernández et al. 2009).

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, el modelo fue el J20, un ratón transgénico que expresa la APP humana mutada. La

inhibición del receptor P2X7, administrando intraperitonealmente el BBG, aunque ahora existen otros antagonistas más eficaces, pero más tóxicos, resultó en una clara disminución de las placas de amiloide en el hipocampo, tanto en número como en tamaño. Esta reducción la correlacionamos con una disminución de la actividad de la glucógeno sintasa quinasa-3, GSK-3, de los ratones J20, lo que incrementaba el proceso proteolítico de la proteína precursora de amiloide, APP, a través de la α -secretasa. Estos datos demostraron fehacientemente que los antagonistas del receptor P2X7 pueden ser muy útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y suponen una esperanza para esta dolorosa enfermedad neurodegenerativa (Díaz-Hernández et al. 2012).

Otros autores han implicado al receptor P2X7 en gran número de procesos inflamatorios, siendo muy importantes los trabajos realizados por el Dr. Pablo Pelegrin en Murcia (Baroja-Mazo A, Pelegrín P. 2012; Barberà-Cremades et al. 2017).

La implicación de este receptor en múltiples patologías movilizó muchos recursos para el desarrollo de inhibidores selectivos del P2X7 por parte de las grandes compañías farmacéuticas. El primer problema es que las diferencias entre especies son muy acusadas y los compuestos que actúan bien sobre los ratones, no son ideales en los humanos. Uno de los inhibidores muy usado, tanto en humanos como en roedores con afinidad nano Molar, es el A438079, que es un antagonista competitivo. Este compuesto ha resultado eficaz en el tratamiento de las crisis epilépticas refractarias (Jiménez –Pacheco et al. 2013). Otros antagonistas del receptor P2X7 han sido ensayados en humanos, uno de ellos para el tratamiento de la artritis reumatoide (Jacobson and Müller, 2016).

2.3.2.5 Cascadas de señalización de los receptores ionotrópicos P2X.

En neuronas, la entrada de calcio mediada por los receptores P2X produce una despolarización que induce a su vez la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que incrementa significativamente los niveles de calcio citosólico libre. Dicho incremento activa distintas cascadas de señalización que, en función del tipo neuronal, pueden estar implicadas en la regulación de proteínas quinasas como la Ca^{2+} -calmodulina quinasa II (CaMKII) (Díaz-Hernández *et al.* 2004, Díaz-Hernández *et al.* 2006, Leon *et al.* 2006), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la proteína quinasa C (PKC) o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Díaz-Hernández *et al.* 2008, Gómez-Villafuertes *et al.* 2009, Ortega *et al.* 2009), así como en la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina (Díaz-Hernández *et al.* 2002), el glutamato (Gualix *et al.* 2003) o el GABA (Gómez-Villafuertes *et al.* 2001).

La señalización mediada por el P2X7, tiene la peculiaridad de que no se desensibiliza y permite el paso de una gran cantidad de ion Ca^{2+} , lo que puede llevar incluso a la muerte celular. Pero no todas las células responden del mismo modo, ya que la presencia masiva del receptor se observa sobre todo en células sanguíneas como los macrófagos y en células de microglía activada. En la gran mayoría de las células nerviosas este receptor está localizado en zonas muy específicas, sobre todo cuando el tejido está intacto. Volveremos sobre este tema pues es esencial para comprender como puede el sistema nervioso utilizar sin peligro el receptor P2X7 para funciones tan relevantes como el crecimiento axonal y la reparación de lesiones que inducen crisis epilépticas (Díaz-Hernández *et al.*, 2008; Gómez-Villafuertes *et al.* 2009).

No podemos olvidar que el receptor P2X7, fue caracterizado en astrocitos por la Dra. Esmerilda Delicado, manteniendo todas las características electrofisiológicas. La abundancia depende de las especies, en astrocitos de rata son escasos, mientras que en astrocitos de ratón son muy numerosos, como se puede observar en la (Figura 5).

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 pro-

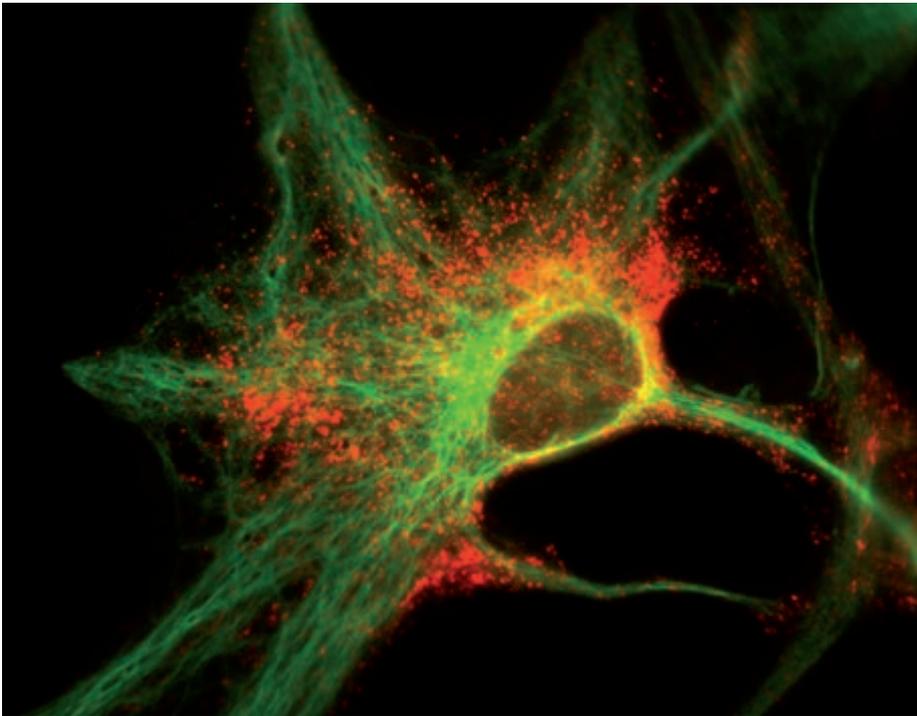


Figura 5. Micrografía de microscopia confocal representativa de un astrocito cerebeloso en cultivo primario. En rojo presencia del receptor ionotrópico de ATP, P2X7. En verde marcador de la proteína fibrilar ácida de glía. Destacar la gran abundancia del receptor P2X7, ya que se han obtenido de ratón. Estos receptores son plenamente funcionales. (Micrografía obtenida por la Dra. Esmerilda García-Delicado)

motor 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.

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. 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).

2.4. Degradación extracelular de los nucleótidos por ectonucleotidasas.

Es de destacar, que por esos caprichos de la investigación, antes de estudiar los receptores de nucleótidos y sus cascadas de señalización, estudiamos los enzimas que los degradaban, concretamente las ectonucleotidasas capaces de hidrolizar los nucleótidos de adenina, como el ATP, y los dinucleótidos, del tipo ApnA, descubiertos en nuestro departamento (Rodríguez del Castillo et al.1988). Las técnicas iniciales de estudio se realizaban con compuestos radioactivos, entre los años 1987 y 1992, (Rodríguez-Pascual et al. 1992; Torres et al. 1990).

En año 1991, el Dr. Rotllán desarrolló una nueva técnica mediante derivados fluorescentes, los eteno derivados de nucleótidos de adenosina, acoplados a la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, lo que nos permitió evaluar la degradación de estos compuestos, por los enzimas presentes en células neurales, neuroendocrinas y en células de endotelios vasculares, con gran precisión. Cada tipo celular presentaba un patrón diferente de hidrólisis lo que indicaba que existían diferentes ecto-nucleotidasas. En aquel momento las ecto-nucleotidasas no estaban clonadas y nuestros resultados y técnicas supusieron un gran avance en su identificación (Rotllán et al. 1991; Mateo et al.1966; 1997a; 1997b; Miras-Portugal et al. 1999).

Todos los nucleótidos utilizados en la señalización extracelular se degradan por una batería de ecto-nucleotidasas, que pueden degradar los nucleótidos eliminando los grupos fosfatos de muy diversos modos. Estos enzimas están localizados en la membrana plasmática con el centro catalítico hacia el espacio extracelular. Existen varias familias y se denominan genéricamente ecto-nucleotidasas. Los nucleótidos trifosfato, ATP o UTP, son hidrolizados gradualmente originando los nucleótidos difosfato, como el ADP y UDP, que tienen

sus propios receptores de la familia metabotrópica (P2Y1, P2Y12, P2Y13), al final de la cascada se forma adenosina o el correspondiente nucleósido. Las diferentes familias de ecto-nucleotidasas presentan propiedades moleculares y funcionales y distintas, destacando la localización tisular, modo de anclaje a la membrana plasmática y características de la cinética enzimática, como especificidad, afinidad por los sustratos, producto formado, pH óptimo, dependencia de cationes etc... Cada una de las familias de ecto-nucleotidasas, contiene un número de isoenzimas variables. También se han descrito formas solubles liberadas al medio extracelular a partir de vesículas sinápticas o por hidrólisis de su anclaje a la membrana, pudiendo medirse su actividad en el plasma, en algunos casos existen isoformas con anclaje de membrana y con un procesamiento alternativo del RNA mensajero para la forma soluble.

Las ectonucleotidasas se clasifican en cuatro subfamilias:

a) Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas): hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato, produciéndose la formación de los correspondientes nucleósidos monofosfato, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas que constituyen esta familia (Kukulski *et al.* 2005). También se las conoce como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ectoapiratasas o CD39. En nuestro laboratorio, en las membranas aisladas de las sinapsis musculares y en la placa motora del pez torpedo es donde hemos encontrado una mayor actividad hidrolítica de los nucleótidos, ya sea ATP, ADP o AMP. Es de destacar que en las sinapsis de la unión neuromuscular, los nucleótidos se liberan conjuntamente con acetilcolina y la actividad de la acetilcolinesterasa, está igualmente localizada y muy abundante en este tipo de hendiduras sinápticas (Mateo et al 1997a; 1997b).

b) Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP): sus tres miembros, NPP1, NPP2 y NPP3, pertenecen a la superfamilia de las fosfatasas alcalinas, cuyo pH óptimo ha de ser alcalino. Hidrolizan enlaces 5'-monodiestéer en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de un nucleosido 5'-monofosfato, AMP, UMP, GMP (Goding *et al.* 2003, Stefan *et al.* 2005). También hidrolizan otros compuestos como los dinucleósidos polifosfato (Ap_nA), liberando AMP y el correspondiente nucleótido Ap_n-1 (Mateo *et al.* 1997a, Mateo *et al.* 1997b, Vollmayer *et al.* 2003). Debido a que los diadenosina polifosfatos habían sido caracterizados por primera vez en nuestro grupo de investigación, los enzimas capaces de hidrolizarlos recibieron especial atención. Recientemente Javier Gualix y Rosa Gómez-Villafuertes, han demostrado que la diferenciación neural en algunos modelos implica un cambio en la actividad y distribución topográfica en la superficie de la neurona de esta familia de hidrolasas: ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, E-NPP; principalmente de los subtipos NPP1 y NPP3 (Gómez-Villafuertes *et al.* 2014).

c) Fosfatasas alcalinas: forman homodímeros con tres cationes en el sitio catalítico (dos átomos de Zn^{2+} y uno de Mg^{2+}), liberando el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizando además los nucleótidos 5'tri-, di- y monofosfato, finalizando con la formación de los correspondientes nucleósidos precursores (Millan 2006).

Nuestro grupo ha realizado importantes aportaciones revelando que la fosfatasa alcalina no específica de tejido, TNAP, es esencial en el desarrollo y crecimiento de los axones, tanto en cultivos de neuronas de hipocampo, como *in vivo*, en el desarrollo embrionario y fetal del cerebro de mamíferos (Díez-Zaera *et al.* 2011; Sebastián-Serrano *et al.* 2016)

d) Ecto- 5'-nucleotidasa o CD-73: cataliza la etapa final de la cadena hidrolítica de los nucleótidos, generando los respectivos nucleósidos. Se trata de una proteína dimérica de unión a zinc anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI) con una amplia distribución tisular (Zimmermann 1996, Zimmermann 2000).

El resultado final de la acción de la cascada extracelular de ectonucleotidasas es, que el ATP y cualquier otro nucleótido, son rápidamente degradados una vez que son liberados por exocitosis al espacio extracelular, o inyectados directamente al torrente sanguíneo.

Nuestros resultados en el sistema nervioso demuestran que las ecto-nucleotidasas son un elemento esencial en las acciones fisiológicas de los nucleótidos y forman parte del conjunto denominado señalización purinérgica.

3. IMPLICACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso de los mamíferos contiene una gran abundancia y variedad de receptores P2X y P2Y, los cuales presentan una distribución precisa según las regiones y el tipo de célula, teniendo en cuenta además la localización subcelular. Trataremos en este apartado de analizar en qué situaciones patológicas juegan un papel relevante, teniendo en cuenta que el ATP es liberado de neuronas y astrocitos y funciona en las conexiones sinápticas con otros transmisores en el proceso conocido como cotransmisión. Los nucleótidos están implicados en el aprendizaje y la memoria, la actividad locomotora y otras muchas actividades cerebrales (Burnstock Review 2015). Su participación en procesos tan relevantes hace que alteraciones en la señalización a través de los P2X y P2Y pueda ser el origen de diversas patologías, o una consecuencia de ellas. Sabemos hoy día que los receptores P2X y P2Y son esenciales en la formación y maduración del sistema nervioso y que alteraciones de su funcionamiento originan graves patologías a nivel central y periférico. Basten algunos ejemplos, la actividad inflamatoria donde juegan un papel las células de la microglía. Las cuales al transformarse en microglía reactiva incrementan en gran medida el número de receptores, P2X4 y P2X7. La capacidad del receptor P2X7 de introducir gran cantidad de ion calcio al activarse, ya que no se desensibiliza, puede producir la muerte neuronal, lo que ha sido demostrado en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, pudiendo estar en el origen de algunos tipos de Parkinson. De modo similar se ha argumentado en otras enfermedades como Alzheimer, esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica, donde en algunos casos están incrementados los receptores P2X7 (Burnstock, 2015). Analizaremos algunas patologías en las cuales hemos tenido una experiencia directa, como son la enfermedad de Alzheimer familiar, ligada a hiperproducción de las

formas mutadas de la proteína precursora de amiloide, APP; y la de Huntington, de las que hemos dejado ya constancia en el apartado de la farmacología del receptor P2X7. El descubrimiento por nuestro grupo de la presencia del receptor P2X3 en terminales colinérgicas del sistema nervioso central, ha servido para postularlo como una diana en el tratamiento de la migraña (Díaz-Hernández et al. 2001; Hullugundi et al., 2013).

3.1. Receptores P2Y2 y P2X7, el ying y el yang en las placas de β amiloide.

Las enfermedades neurodegenerativas, en este caso la de Alzheimer, han sido analizadas desde muchos puntos de vista. En este caso concreto, la descripción de Alois Alzheimer de la presencia de acúmulos, a los que denominó, placas de amiloide, fuera y de los ovillos neurofibrilares dentro de la neurona, daban por sentado que esos acúmulos eran los responsables de la enfermedad. La investigación se orientó hacia dilucidar su composición y explicar cómo se originaban en el tejido *in vivo*. Sabemos hoy día que el Alzheimer temprano familiar, que quizás solo representa un escaso 1-3%, del total de los casos, está asociado con mutaciones de la proteína precursora de amiloide, APP, o implicadas en su procesamiento, las preselininas 1 y 2. Enzimas que se encuentran en las membranas de la neurona y también se denominan γ secretasas, produciendo el corte definitivo, que origina el péptido de 40 aminoácidos que no es amiloidogénico, o el de 42, que sí lo es. El péptido de 42 aminoácidos se origina por el corte inicial con la β secretasa seguido de la γ secretasa. El péptido de 40 aminoácidos procede por el corte inicial de la α secretasa, seguido por la γ secretasa.

Un aspecto muy relevante, descubierto por nuestro grupo, fue que en células neurales en cultivo, la actividad de la α secretasa, estaba regulada positivamente por el receptor P2Y2 y negativamente por el P2X7. Lo que resultaba en una disminución de la producción de β amiloide con la activación del P2Y2, o un incremento de la producción del β amiloide al activar el P2X7 (León-Otegui et al. 2011). Este hecho implicaba un cambio del paradigma, ya que a través de receptores e membrana podría iniciarse una nueva terapia, reduciendo los niveles de producción del péptido amiloidogénico. Como todas las hipótesis, sería necesario confirmarlo y tratamos de validarlo en el modelo transgénico de ratón, el J20, que se considera un buen

modelo para estudiar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Es importante destacar que en el Alzheimer esporádico, que son más del 90% de los casos, no se comprende bien como se produce ese cambio en el procesamiento de APP y como es el *turnover* de las placas en su fase inicial de acúmulo.

Los ratones no desarrollan Alzheimer, es decir no desarrollan placas de amiloide. Para que eso suceda se necesita un ratón que, además de expresar su propia proteína, la APP-murina, expresase una forma mutante de la proteína precursora de amiloide humana, conteniendo las mutaciones Swedish (K670N/M671L) y la Indiana (V717F) mutations (APPSwInd). A este modelo de ratón se le conoce como J20 y desarrollan las características placas de amiloide entre los 6 y los 8 meses de edad. (Díaz-Hernández et al. 2012).

¿Cómo consigue el receptor P2Y2 activar la α secretasa? Siguiendo la lógica, la activación de este receptor induce la interacción con una proteína G, de tipo Gq, que activa a la fosfolipasa C, PLC, de la membrana plasmática. Esto produce la hidrólisis del fosfatidil inositol trifosfato, generando el inositol trifosfato, IP3, y el diacilglicerol. La movilización de calcio de los almacenes internos de la célula es activada por el IP3, abriendo los canales de calcio del retículo lo que incrementa el calcio en el citosol (Harden et al. 1995; Schachter et al. 1997; Paniagua-Herranz et al. 2017). El calcio y el diacilglicerol activan la proteína quinasa C que va a fosforilar la α secretasa. Este es un enzima de membrana, por lo que la proteína APP, que también es de membrana será procesada en mayor medida del modo no amiloidogénico.

Lo ideal para evitar acúmulos de α amiloide sería poder tratar a los ratones modelo con agonistas del receptor P2Y2, lo que es muy fácil en cultivos celulares, con ATP, o UTP, o el dinucleótido de uri-

dina, el Up4U, pero ninguno de ellos se puede administrar al animal entero, ya que es metabolizado de modo inmediato y no existe por el momento ningún agonista, o efector alostérico descrito, y todavía menos que se pueda administrar por vía oral.

Este contratiempo hizo pensar en la alternativa, que sería bloquear el efecto negativo del receptor P2X7 sobre la α secretasa, realizado a través de la GSK 3. La administración de los antagonistas del receptor P2X7, concretamente el azul brillante, BBG, reducía drásticamente la aparición y tamaño de las placas de β amiloide (Díaz-Hernández et al. 2008; Miras-Portugal et al. 2015). Existen actualmente muchos otros antagonistas susceptibles de ser administrados. Estos resultados permiten, al menos, afirmar que existe una estrategia, la cual no tiene por qué estar restringida a la combinación de los receptores purinérgicos.

3.2. Alzheimer y el lio de los ovillos neurofibrilares, la proteína tau extracelular, los receptores muscarínicos y la fosfatasa alcalina: Una sorpresa con lógica.

Hay un grupo de investigadores en Alzheimer que no 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, 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 del β amiloide, conocida como *Baptistas* y los del *Tau* conocidas como *Taoistas*. Posiblemente todo sea todavía más complejo y todos tengan razón. En colaboración con el gran investigador Jesus Avila, reconocido *taoísta*, encontramos por puro azar, que la proteína *tau* y sus péptidos, podían actuar sobre las neuronas en cultivo, incrementando la señal de calcio. Los receptores sobre los que actuaban, 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 (Gómez-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 conexión de esta señalización colinérgica mediada por *tau* con la fosfatasa alcalina, fue fruto de una tesis y un desmayo. La tesis estaba dirigida por Jesús Avila, sobre *tau* y sus múltiples posibilidades de fosforilación. La doctoranda era Alicia Rubio, quien se desmayó durante la presentación pública de la tesis. Yo formaba parte del jurado, y en ese tiempo, mientras se recuperaba la doctoranda, me puse a pensar. La lógica era la siguiente: que las neuronas liberan las proteínas *tau*, más o menos fosforiladas y además en el espacio extracelular las proteasas allí presentes las van a degradar en péptidos más pequeños. Curiosamente, en todos los ensayos que habíamos realizado durante la colaboración no habíamos prestado atención al estado en que se encuentran los péptidos en el espacio extracelular habiendo tal cantidad de enzimas hidrolíticas. Acabada la tesis *cum laude*, se me ocurrió que teníamos una pregunta esencial, sencilla y clara, a la que no habíamos respondido en las colaboraciones previas: ¿Están o no, fosforilados los péptidos de tau que actúan sobre los receptores muscarínicos?

La respuesta nos llevó a demostrar que no están fosforilados, y además que el enzima extracelular que los defosforila es la fosfatasa alcalina no específica de tejido, TNAP, que está asociada a la membrana plasmática y es totalmente inespecífica. Tirando del hilo un poco más, en muestras de tejidos humanos procedentes de enfermos de Alzheimer, comprobamos que la actividad de la fosfatasa alcalina estaba aumentada, cuando se comparaba con sujetos normales de la misma edad (Díaz-Hernández 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 acúmulo 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.

3.3. Crecimiento de los axones y regeneración axonal, la importancia del receptor P2X7.

Durante el desarrollo embrionario y fetal los axones llegan a su destino de modo preciso. La cuestión es comprender como lo alcanzan y que señales los guían. Uno de los grandes investigadores en esta área, el profesor Marc Tessier-Lavigne, de origen canadiense y actualmente Presidente de la Universidad de Stanford, dedico su vida investigadora a comprender como se realizaba la guía axonal y completó la hipótesis de Cajal sobre la necesidad de la existencia de sustancias quimio-atractivas o quimiotróficas, demostrando su existencia, pero también la de quimio-repelentes para guiar los axones. En una fecha tan temprana como 1991, demuestra que la orientación de los axones in vitro responden 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 para comprender el cableado axonal del cerebro, y no es nuestra intención desarrollarlo aquí.

En trabajos del grupo con terminales sinápticas aisladas y neuronas en cultivo, observábamos que estaban presentes receptores ionotrópicos P2X funcionales, con entrada de calcio (Pintor et al. 1995c; Díaz-Hernández et al. 2002; 2006; Miras-Portugal et al. 2003). La cuestión que nos planteamos es si en neuronas aisladas estos receptores también estaban localizados en zonas específicas que podrían tener un papel importante en el desarrollo, elongación y ramificado de los incipientes conos de crecimiento. Para llevar a cabo el estudio utilizamos como modelo las neuronas aisladas de hipocampo fetal, que sufren cambios morfológicos acusados durante los primeros días en cultivo.

Por la literatura científica, sabíamos que la formación del axón está regulada por factores neurotrópicos, neurotransmisores a través de diferentes receptores y canales de diversa naturaleza. Todos ellos con muy variadas cascadas de señalización, entre ellas las de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, que es esencial para generar el movimiento ameboideo y crecimiento (Bradke and Dotti, 1999; da Silva and Dotti, 2002; Shi et al. 2003; 2004; Garrido et al. 2007). 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. 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).

El efecto negativo de la activación del P2X7 sobre el crecimiento axonal fue validado usando antagonistas, como el BBG, que revirtió el efecto negativo, llevando al crecimiento y ramificación el axón. 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 P2X2 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.

Los resultados con una línea tumoral, el neuroblastoma N2a, permitieron analizar en profundidad la cascada de la Ca^{2+} /calmodu-

lin-dependiente quinasa II que media la inhibición de la neurogénesis en este modelo. 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 (Gómez-Villafuertes et al. 2009). (Figura 6).

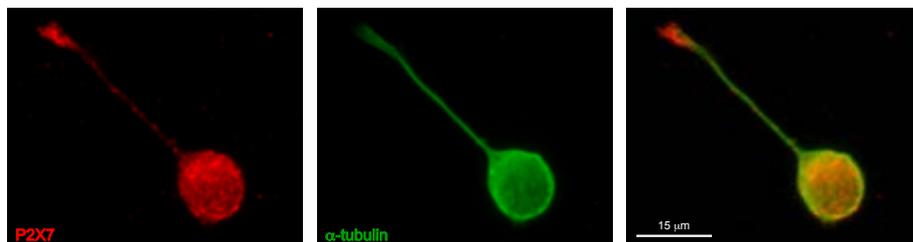


Figura 6. Micrografía de microscopia confocal de neuronas de la línea tumoral N2a, sometidas a diferenciación añadiendo al medio de cultivo el azul brillante G, BBG, antagonista del receptor P2X7. Panel izquierdo inmunohistoquímica del Receptor P2X7, presente esencialmente en el soma y la terminal de cono de crecimiento axonal. Panel central, Inmunohistoquímica del marcador del citoesqueleto de tubulina. Panel derecho, superposición e ambos marcajes. (Micrografía obtenida por la Dra. Rosa Gómez-Villafuertes)

3.3.1 En el cono de crecimiento el P2X7 está acompañado del P2Y1 y el P2Y13.

En el cono de crecimiento el receptor P2X7 está acompañado por los receptores P2Y1 y P2Y13, que causan efectos opuestos y son activados por el agonista fisiológico ADP, un producto de la degradación del ATP por la nucleótido trifosfo-difosfo hidrolasa, ENTP-NDP hidrolasa, también conocida como CD39 o apirasa (Pérez-Sen et al, 2017).

Para estudiar el dialogo establecido entre los receptores P2Y1, P2Y13 y P2X7, fue necesario emplear agonistas y antagonistas para cada uno de los receptores y además mediante construcciones de plásmidos shRNA con reporteros, para controlar la calidad de la expresión pudimos observar que el ADP y la expresión del P2Y1-GFP, mejoraban la elongación axonal, por el contrario el receptor P2Y13 y el P2X7 paraban el crecimiento axonal. Esta actividad estaba coordinada por la adenilato ciclasa tipo 5, que es la que se encuentra en el cono de crecimiento y que es inhibida por calcio, que es lo que moviliza el P2X7 al abrir el receptor ionotrópico y el P2Y1 movilizándolo a través del retículo.

La inhibición del P2X7 con azul brillante G, BBG, reduce la entrada de calcio y la adenilato ciclasa tipo 5 no se inhibe, con lo cual el citoesqueleto de actina es suficientemente dúctil, ya que el AMPc se incrementa, por lo que puede crecer y al mismo tiempo no interferir en el efecto de los factores neurotróficos que funcionan a través de la cascada de la PI3K-Akt-GSK3 (del Puerto et al. 2012).

El receptor P2X7 también modula el funcionamiento de la zona inicial del axón, tanto en condiciones fisiológicas como en las lesiones cerebrales. Este receptor y sus agonistas modulan tanto las proteínas estructurales, como la densidad de los canales iónicos, en cortes de

cerebro, en neuronas de hipocampo en cultivo el P2X7-unido a la proteína verde fluorescente, reduce la expresión de la ankyrina G y de los canales voltaje dependientes de Na⁺. La inhibición del P2X7 con BBG evita la disrupción de los endotelios vasculares después de isquemia y reperfusión en ratas (del Puerto et al. 2015).

3.3.2. ¿Cómo consigue crecer un axón en el cerebro fetal si en el medio extracelular hay ATP? Función de la TNAP

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)

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. Estos estudios se hicieron en cultivos de neuronas embrionarias de hipocampo, donde se podía observar que al madurar las neuronas liberaban más ATP, pero también expresaban mucha más enzima. La inhibición del enzima con el Levamisol, disminuía drásticamente la longitud de los axones, ya que el ATP no se hidrolizaba (Diez-Zaera et al. 2011).

La cuestión es ¿qué ocurre en el cerebro intacto? La aproximación experimental es compleja, pero por suerte existe un ratón trans-

génico, que nos facilitó 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 espontáneas. 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.

3.4. Nucleótidos en neuroregeneración y neuroprotección.

Las lesiones del tejido nervioso liberan una gran cantidad de factores, que por supuesto incluyen los nucleótidos. Muchos de ellos pueden ser necesarios en un primer momento y después ser nocivos para la correcta reparación del sistema, o viceversa. Las células madre progenitoras se consideran actualmente como capaces de reparar el sistema nervioso en un futuro próximo, aunque son muchas más las cuestiones que los datos inequívocos de su posible utilización. La reparación de la médula espinal lesionada, es una de las áreas en donde se han hecho más ensayos y algunos avances significativos, aunque los éxitos dependen en gran medida de la gravedad de la lesión y el tiempo transcurrido cuando se inicia el tratamiento.

El cultivo y diferenciación de las células madre precursoras de la zona subventricular, tiene la ventaja de la gran cantidad de conocimiento acumulado y la gran plasticidad observada. Los receptores de nucleótidos están presentes en todos los progenitores y son susceptibles de inducir diferenciación específica.

Finalmente, la señalización por nucleótidos converge en una serie de cascadas intracelulares, las cuales están especialmente dirigidas a proteger las células neurales y por lo tanto a la neuroprotección, demostrado en el estrés oxidativo por radicales libres de oxígeno, ROS, y en el estrés genotóxico por compuestos antivíricos y anti tumorales.

Desarrollaremos estos tres aspectos con un poco más de detalle en los siguientes apartados.

3.4.1. Señalización purinérgica en la reparación de la medula espinal lesionada.

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, se produce la pérdida de los axones, por la pérdida de la mielina y muerte de los oligodendrocitos, que son los protectores axonales, así como todo tipo de células tanto interneuronas de la médula espinal, como neuronas motoras (Grossman et al. 2001).

No existe por el momento un tratamiento eficaz para estas lesiones graves de la medula espinal, aunque hay algunos ensayos clínicos. Una de las estrategias es el trasplante de células precursoras para la cicatrización (Mothe and Tator, 2013). Las células madre progenitoras ependimales, 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 movilizada 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).

Recientemente, nuestro grupo demostró que las células madre progenitoras ependimales, epSPC, expresan receptores para nucleótidos, siendo los más abundantes los ionotrópicos P2X₄ y P2X₇,

ambos funcionales y los metabotrópico 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 (Gómez-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 (Gómez-Villafuertes et al., 2015).

Las células epSPC agrupadas en neuroesferas, inician una salida paulatina cuando están en cultivo. 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 interaccionando con el factor asociado al espliceosoma SF-3A1 (Díaz-Hernández et al., 2015) (Figura 7).

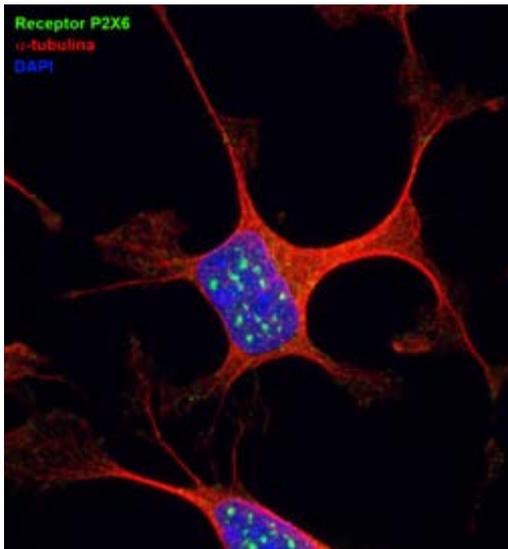


Figura 7. Micrografía de microscopía confocal de células madre progenitoras obtenidas de los cultivos ependimales de médula espinal de ratas lesionadas. Destacar la citoarquitectura marcada en rojo para el citoesqueleto de tubulina. Destacar el gran tamaño del núcleo donde el DNA cromosómico está marcado en azul, con DAPI. Finalmente, destacar la presencia del receptor P2X6 en estructuras definidas del núcleo celular, en color verde claro. Trabajos e nuestro grupo los han relacionado con la función de los espliceosomas. (Micrografía obtenida por el Dr. Juan Ignacio Díaz-Hernández)

3.4.2. Factores nucleares implicados en la regeneración nerviosa y su relación con la señalización purinérgica.

Las neuronas lesionadas tienen la capacidad de cambiar la expresión de genes asociados con la regeneración. Un gran número de estos factores han sido identificados hasta el momento, entre ellos c-Jun, sox11, CREB, Smad1, ATF3, AKRD1, NFIL3, p53, STAT3, C/EBPb, et. La cuestión es cómo se interrelacionan unos con otros para expresar los genes adecuados (Kiryu-Seo and Kiyama, 2011). 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 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 publicó en la revista Cell un trabajo pionero titulado: *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II*. (Dyan 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).

Los receptores purinérgicos P2X7 y P2X4, implicados en la regeneración del Sistema Nervioso Central, SNC, están regulados transcripcionalmente por Sp1 en condiciones basales y aumenta su

expresión en condiciones patológicas (García-Huerta et al. 2012; El receptor P2X7 tiene un especial interés para nosotros ya que como hemos descrito antes es un inhibidor del crecimiento del axón y de la neurogénesis y en otros casos inductor de la muerte celular (Díaz-Hernández et al, 2008; Gómez-Villafuertes et al. 2009). El factor Sp1 está regulado por fosforilación de numerosas proteínas quinasas, que relacionan el metabolismo con la expresión del receptor P2X7. Los niveles nucleares de Sp1 se reducen drásticamente por inhibición de la cascada de señalización de la PI3K/Akt y además por el bloqueo de la transcripción dependiente de Sp1 por el antitumoral Mitramicina, que es un inhibidor de gran especificidad y afinidad. Existen otras muchas cascadas de señalización para el control de expresión del receptor P2X7, entre ellas la acción de las fosfatasas duales, DUSP, capaces de revertir la señalización de múltiples cascadas de señalización celulares (Queipo et al. 2018).

En situaciones comprometidas para el cerebro, después de una lesión traumática, o mediante inyección de agonistas de los receptores ionotrópicos de Glutamato, en los modelos de epilepsia experimental, del lóbulo temporal, se incrementa la expresión de Sp1 en el hipocampo, preferencialmente en el giro dentado. Este efecto coincide con la formación de una nueva progenie celular derivada de progenitores neurales, que expresan el receptor P2X7 en abundancia y largan sus axones en fases posteriores hasta CA1 y CA3. La sobre expresión del P2X7 origina epilepsia conocida como *estatus epilepticus*, y los antagonistas del P2X7 son muy eficaces en su tratamiento, por el momento ensayados en modelos de rata y ratón (Engel et al., 2012a; 2012b; Henshall et al., 2013; Jimenez-Mateos et al., 2013, 2016).

La implicación del Sp1 en el control de la expresión de otros receptores purinérgicos y sus implicaciones en la fisiopatología del sistema nervioso es un área todavía por explorar.

3.4.3. Progenitores de la zona subventricular y receptores de nucleótidos en cerebro adulto.

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 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).

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 (Gómez-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).

3.4.4. Receptores P2X y P2Y en neuroprotección.

En las lesiones cerebrales, los receptores cerebrales de nucleótidos se adaptan a las nuevas situaciones y actúan además como sensores del ATP y sus metabolitos, liberados al medio extracelular. El desarrollo de procesos inflamatorios ha sido descrito y por ello mucha de la terapia posterior a la lesión se ha basado en el empleo de antagonistas de los receptores P2X y P2Y. Es necesario, no obstante, que la activación de los receptores nucleotídicos, en respuesta a una agresión, puede resultar beneficiosa o lesiva, según cual sea la naturaleza del toxico empleado, o el modelo celular en el que se realizan los experimentos.

La gran mayoría de los experimentos se realizan en cultivos celulares y uno de los más empleados es el de las neuronas granulares del cerebelo. Estas células se obtienen del cerebelo inmaduro en los primeros días post-natales, adquiriendo características neurales y respuestas electrofisiológicas después de 7 días en cultivo (Ortega et al., 2008).

La presencia del receptor P2Y₁₃ en las células granulares acoplado a la proteína G_i y su efecto sobre la translocación de la beta-catenina al núcleo, proporcionó otra visión de las funciones de los receptores nucleotídicos de ADP. Además el efecto estaba mediado por la fosforilación del enzima glucógeno sintasa quinasa 3, GSK-3, que es un cruce de vías de señalización hacia la supervivencia o la destrucción celular (Ortega et al 2008). El receptor P2Y₁₃ también está implicado en la activación del factor Nrf2 es esencial en la activación y translocación al núcleo de la Hemo-Oxigenasa, tipo 1, HO-1, que protege del estrés frente al agua oxigenada y radicales de oxígeno (Espada et al. 2010). Posteriormente se comprobó la eficacia del receptor P2Y₁₃ en la neuroprotección frente al estrés genotóxico, con compuestos anticancerígenos, como es el cis-platino, con vías de señalización que ponen en juego la proteína P38 y las proteína

fosfatasa duales, DUSP, en este caso concreto la DUSp2, entre otras (Morente et al. 2014).

En las mismas células el receptor ionotrópico, P2X7, que permite la entrada de calcio, también tiene un efecto neuroprotector. Este efecto depende de la entrada de calcio extracelular y del enzima Proteína quinasa C, PKC, siendo independiente de la cascada de la PI3-K (phosphatidyl-inositol-3-kinase)/Akt, que es la principal vía de supervivencia asociada con las neurotrofinas (Ortega et al. 2009). Por ese motivo se estudió la posibilidad de una interacción entre los receptores P2X7 y las neurotrofinas, concretamente con el factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF. Ambas señalizaciones convergen en el enzima glucógeno sintasa quinasa -3 (GSK-3) ejerciendo un poderoso efecto neuroprotector, otras neurotrofinas ejercen efectos similares, por lo que se puede pensar que en el cerebro envejecido, en donde está descrita la disminución de neurotrofinas en etapas avanzadas, siendo uno de los factores en las enfermedades neurodegenerativas, esa disminución podría paliarse incrementando la señalización purinérgica (Ortega et al., 2010).

4. CONSIDERACIONES FINALES.

En área de la señalización purinérgica y sobre todo la mediada por los nucleótidos, es la última en haber llegado a la arena de la farmacología. Son los únicos agentes extracelulares de señalización de pequeño tamaño, cuyos receptores han sido clonados para demostrar su existencia y carentes de la farmacología previa que tanta ayuda a prestado al estudio de las catecolaminas o la acetilcolina, previas a su identificación génica.

Aunque cada vez tenemos acumulada más información, todavía seguimos buscando agonistas que actúen *in vivo*, y nos permitan establecer cuáles son sus cometidos fisiológicos y su papel real en la fisiopatología. Los estudios en esta área se basan más en los modelos de animales transgénicos que en casos reales de disfunciones conocidas. Existen no obstante excepciones, el receptor P2Y₁₂ 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 anti-trombótico, 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 P2Y₁₂ (Hollopeter G. et al., 2001). En el sistema nervioso central el P2X₇ participa en todo tipo de tareas, tanto en neuronas como en astrocitos y su promotor asociado a un reportero fluorescente permite ver la importancia en el desarrollo y las vías que siguen los axones. Por ese motivo el futuro del área está garantizado y son muchas las potencialidades que se abren, unas de conocimiento básico puro y otras de inmersión en una nueva farmacología.

BIBLIOGRAFIA

ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. (1994) *Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?* Pharmacol Ther. 1994; 64(3):445-75. Review. PMID: 7724657

ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G, BOEYNAEMS JM, BARNARD EA, BOYER JL, KENNEDY C, KNIGHT GE, FUMAGALLI M, GACHET C, JACOBSON KA, WEISMAN GA. (2006) *International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.* Pharmacol Rev. 2006 Sep;58(3):281-341. Review. PMID: 16968944

AMES B. N., R. CATHCART, E. SCHWIERS AND P. HOCHSTEIN (1981). *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis.* PNAS 1981 November, 78 (11) 6858-6862.

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.

BACONGUIS I., HATTORI M., GOUAUX E. (2013). *Unanticipated parallels in architecture and mechanism between ATP-gated P2X receptors and acid sensing ion channels.* Curr Opin Struct Biol. 2013 Apr;23(2):277-84. doi: 10.1016/j.sbi.2013.04.005. Epub 2013 Apr 26. Review.PMID:23628284.

BANNASCH D., SAFRA N., YOUNG A., KARMI N., SCHAIBLE R.S., LING G.V. (2008). *Mutations in the SLC2A9 gene cause hyperuricosuria and hyperuricemia in the dog.* PLoS Genet. 2008 Nov;4(11):e1000246. Epub 2008 Nov 7.

BARBERÀ-CREMADES M., GÓMEZ A.I., BAROJA-MAZO A., MARTÍNEZ-ALARCÓN L., MARTÍNEZ C.M., DE TORRE-MINGUELA C., PELEGRÍN P. (2017) *P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF- α Production*. *Front Immunol*. 2017 Jul 24;8:862. doi: 10.3389/fimmu.2017.00862. eCollection 2017. PMID: 28791020.

BAROJA-MAZO A., PELEGRÍN P. (2012) *Modulating P2X7 Receptor Signaling during Rheumatoid Arthritis: New Therapeutic Approaches for Bisphosphonates*. *J Osteoporos*. 2012;2012:408242. doi: 10.1155/2012/408242. Epub 2012 Jul 8. PMID:22830074.

BEN-ARIE N., BELLEN H.J., ARMSTRONG D.L., McCALL A.E., GORDADZE P.R., GUO Q., MATZUK M.M., ZOGHBI H.Y. (1997) *Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons*. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):169-72. PMID: 9367153.

BERNE, R.M. 1963. *Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow*. *Am J Physiol* 204, 317–322.

BONNER J.T., L.J. SAVAGE. *Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum*. *Journal of Experimental Zoology Part A...*, 1947.

BONNER JT. *Induction of Stalk Cell Differentiation by Cyclic AMP in the Cellular Slime Mold Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 65, No. 1, pp. 110-113, January 1970.

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

BROWN J.P., COUILLARD-DESPRÉS S., COOPER-KUHN C.M., WINKLER J., AIGNER L., KUHN H.G. (2003). *Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis*. J Comp Neurol. 2003 Dec 1;467(1):1-10. PMID: 14574675.

BUHR C., GÖSSL M., ERBEL R., EGGBRECHT H. (2008). *Regadenoson in the detection of coronary artery disease*. Vasc Health Risk Mag. 2008;4(2):337-40. Review. PMID:18561509.

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

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

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

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

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

— *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.

— *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. PMID:28735873.

— *Purinergic Signalling: Therapeutic Developments*. Front Pharmacol. 2017 Sep 25;8:661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661. eCollection 2017. Review. PMID:28993732.

BURNSTOCK, G., ULRICH, H., (2011). *Purinergic signaling in embryonic and stem cell development*. Cell Mol. Life Sci. 68, 1369e1394.

BURNSTOCK G., VERKHRATSKY A. *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.

CANO-SOLDADO P., PASTOR-ANGLADA M. (2012) *Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition*. Med Res Rev. 2012 Mar;32(2):428-57. doi: 10.1002/med.20221. Epub 2011 Feb 1. Review.PMID:21287570

CARRASQUERO L.M., DELICADO E.G., BUSTILLO D., GUTIÉRREZ-MARTÍN Y., ARTALEJO A.R., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2009) *P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes*. J Neurochem. 2009 Aug;110(3):879-89. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06179.x. Epub 2009 May 18. PMID: 19457067.

CHUNG J., WANG X., MARUYAMA T., MA Y., ZHANG X., MEZ J., SHERVA R., TAKEYAMA H; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, LUNETTA K.L., FARRER L.A., JUN G.R. (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.

CIANA P., FUMAGALLI M., TRINCAVELLI M.L., VERDERIO C., ROSA P., LECCA D., FERRARIO S., PARRAVICINI C., CAPRA V., GELOSA P., GUERRINI U., BELCREDITO S., CIMINO M., SIRONI L., TREMOLI E., ROVATI G.E., MARTINI C., ABBRACCHIO M.P. (2006) *The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor*. EMBO J. 2006 Oct 4;25(19):4615-27. Epub 2006 Sep 21. PMID: 16990797.

CODDOU C., YAN Z., OBSIL T., HUIDOBRO-TORO J.P., STOJILKOVIC S.S. (2011). *Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels*. Pharmacol Rev. 2011 Sep;63(3):641-83. doi: 10.1124/pr.110.003129. Epub 2011 Jul 7. Review.PMID:21737531.

COLAMARINO S.A., 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.

CUI G., ZHANG S., ZOU J., CHEN Y., CHEN H. (2017). *P2Y12 receptor gene polymorphism and the risk of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature*. Adv Clin Exp Med. 2017 Mar-Apr;26(2):343-349. doi: 10.17219/acem/63745. Review. PMID: 28791856.

CUNHA R. A. (2016). *How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration?* J. Neurochem. 139 1019–1055. 10.1111/jnc.13724.

DA SILVA, J. S. AND DOTTI, C. G. (2002). *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis*. Nat. Rev. Neurosci. 3, 694-704.

DEL PUERTO A., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., TAPIA M., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., BENITEZ M.J., ZHANG J., MIRAS-PORTUGAL M.T., WANDOSELL F., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., GARRIDO J.J. *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., PÉREZ-ALVAREZ M.J., GIRAUD P., CARLIER E., WANDOSELL F., DEBANNE D., GARRIDO J.J. (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.

DÍAZ-HERNÁNDEZ M., PINTOR J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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-VILLAFUERTE R., HERNANDO F., PINTOR J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 M.T. (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 M.T. (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 M.T. (2006). *Role of CaMKII 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-HERNÁNDEZ M., DEL PUERTO A., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., DIEZ-ZAERA M., LUCAS J.J., GARRIDO J.J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 J.M., ALBERCH J., MIRAS-PORTUGAL M.T., LUCAS J.J. (2009). *Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration*. FASEB J. 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 J.R., MIRAS-PORTUGAL M.T., 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.

DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., LEÓN-OTEGUI M., HONTECILLAS-PRIETO L., DEL PUERTO A., TREJO J.L., LUCAS J.J., GARRIDO J.J., GUALIX J., MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2011). *In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases*. Neurobiol Aging. 2012 Aug;33(8):1816-28. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22048123.

DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., LEÓN-OTEGUI M., HONTECILLAS-PRIETO L., DEL PUERTO A., TREJO JL, LUCAS JJ, GARRIDO JJ, GUALIX J, MIRAS-PORTUGAL MT, DÍAZ-HERNÁNDEZ M.(2012). *In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases*. Neurobiol Aging. 2012

Aug;33(8):1816-28. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040.
Epub 2011 Nov 1. PMID:22048123.

DÍAZ-HERNÁNDEZ M., HERNÁNDEZ F., MIRAS-PORTUGAL M.T., 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 J.I., SEBASTIÁN-SERRANO Á., GÓMEZ-VILLAFUERTE R., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 J.I., HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ E., ZIMMERMANN H., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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.

DORMANN D., J.Y KIM, P.N. DEVREOTES, C.J. WEIJER. *cAMP receptor affinity controls wave dynamics, geometry and morphogenesis in Dictyostelium*. J. Cell Sci., 114 (2001), pp. 2513-2523.

DRURY, A.N. 1936. *The physiological activity of nucleic acid and its derivatives*. Physiol Rev 16, 292–325.

DRURY, A.N. & SZENT-GYÖRGYI, A. 1929. *The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart*. J Physiol 68, 213–237.

DYNAN W.S., TJIAN R. (1983) *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II*. Cell. 1983 Mar;32(3):669-80.PMID: 6187469.

EICHINGER L., PACHEBAT J.A., GLÖCKNER G., RAJANDREAM M-A., SUCGANG R., BERRIMAN M., SONG J., OLSEN R., SZAFRANSKI K., XU Q., ET AL: *The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum*. Nature. 2005, 435: 43-57. 10.1038/nature03481.

EMBDEN, G. & ZIMMERMANN, M. (1927). *Über die Bedeutung der Adenylsäure für die Muskelfunktion. 1. Mitteilung: Das Vorkommen von Adenylsäure in der Skelettmuskulatur*. Z Physiol Chem 167, 137–140.

ENGEL T., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., TANAKA K., MESURET G., SANZ-RODRÍGUEZ A., GARCÍA-HUERTA P., MIRAS-PORTUGAL M.T., HENSHALL D.C., DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2012 a) *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.

ENGEL T., JIMENEZ-PACHECO A., MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., HENSHALL D.C. (2012b) *P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2012;4(4):174-87. Epub 2012 Dec 26. PMID:23320131.

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.

ESPADA S., ORTEGA F., MOLINA-JIJÓN E., ROJO A.I., PÉREZ-SEN R., PEDRAZA-CHAVERRI J., MIRAS-PORTUGAL M.T., CUADRADO A. (2010). *The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death*. Free Radic Biol Med. 2010 Aug 1;49(3):416-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.031. Epub 2010 May 4. PMID:20447456.

FISCHER, E. (1881). *Über das Caffein*. Ber deut chem Ges 14, 637–644. — (1907). *Untersuchungen in der Puringruppe*. Springer, Berlin.

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

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

FREUND, H. 1920. *Über die pharmakologischen wirkungendes defibri- nierten blutes*. Arch Exp Pathol Pharmakol 86, 267.

FUMAGALI M., LECCA D., COPPOLINO G.T., PARRAVICINI C., ABRACCHIO M.P. (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.

GARCÍA-HUERTA P., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., DELICADO E.G., PIMENTEL-SANTILLANA M., MIRAS-PORTUGAL M.T., GÓMEZ-VILLAFUERTES 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 J.J., 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.

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 M.T., 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 M.T. (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 M.T. (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 J.I., HUERTA P.G., ARTALEJO A.R., GARRIDO J.J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2009). *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritegenesis 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 M.T., 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 F.J., ALASTRUE-AGUDO A., STOJKOVIC M., MIRAS-PORTUGAL M.T., 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 J.I., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 M.O., GIL-REDONDO J.C., QUEIPO M.J., MENENDEZ-MENDEZ A., PÉREZ-SEN R., DELICADO E.G., GUALIX J., COSTA M.R., SCHROEDER T., MIRAS-PORTUGAL M.T., ORTEGA F. (2017). *Live Imaging Followed by Single Cell Tracking to Monitor Cell Biology and the Lineage Progression of Multiple Neuronal Populations*. J Vis Exp. 2017 Dec 16;(130). doi: 10.3791/56291. PMID: 29286427.

GONZALES E.B., KAWATE T., GOUAUX E. (2009). *Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors*. Nature. 2009 Jul 30;460(7255):599-604. doi: 10.1038/nature08218. PMID: 19641589.

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. Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*. 2009 Jul 30;460(7255):599-604. doi: 0.1038/nature08218.PMID:19641589.

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., GARCÍA-CARMONA F., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 M.D., PINTOR J., ROTLLÁN P., GARCÍA-CARMONA F., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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 M.T. (1999a) *Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles*. *J Neurochem*. 1999 Sep;73(3):1098-104. PMID:10461900.

GUALIX J., ALVAREZ A.M., PINTOR J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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-VILLAFUERTES R., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., MIRAS-PORTUGAL M.T.(2003). *Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain*. J Neurochem. 2003 Oct;87(1):160-71. PMID: 12969263.

GUALIX J., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., PINTOR J., LLANSOLA M., FELIPO V., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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-VILLAFUERTES R., SÁNCHEZ-NOGUEIRO J., TORREGROSA-HETLAND C., BINZ T., GUTIÉRREZ L.M., MIRAS-PORTUGAL M.T., ARTALEJO A.R. (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 T.K., BOYER J.L., NICHOLAS R.A. (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.

HAUPTMAN A. (1912) *Luminal bei epilepsie* München, Verlag J.F. Lehmann, 27. August 1912, 4°, pp.1889-1936.

HENSHALL DC, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, MIRAS-PORTUGAL MT, ENGEL T. (2013). *P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus*. Front Cell Neurosci. 2013 Nov 26;7:237. doi: 10.3389/fncel.2013.00237. Review.PMID:24324404.

HERNDON R. M. (1964) *The fine structure of the rat cerebellum. II. The Stellate Neurons, Granule Cells, and Glia*. J Cell Biol. 1964 Nov 1; 23(2): 277–293. PMCID: PMC2106521.

HERVÁS C., PÉREZ-SEN R., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2005) *Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals*. Biochem Pharmacol. 2005 Sep 1;70(5):770-85. PMID: 16018975.

HERVÁS C., PÉREZ-SEN R., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2003) *Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells*. J Neurosci Res. 2003 Aug 1;73(3):384-99. PMID:12868072.

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

HULLUGUNDI S.K., FERRARI M.D., VAN DEN MAAGDENBERG A.M., NISTRI A. (2013) *The mechanism of functional up-regulation of P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons in a genetic mouse model of familial hemiplegic migraine type 1 (FHM-1)*. PLoS One. 2013;8(4):e60677. doi: 10.1371/journal.pone.0060677. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23577145.

International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. (2011). Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update(Review). Pharmacological Reviews Volume 63, Issue 1, March 2011, Pages 1-34.

JACOBSON K.A., MÜLLER C.E. (2016). *Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors*. Neuropharmacology. 2016 , 104:349. doi:0.1016/j.neuropharm.2015.12.001. Epub 2015 Dec 12. Review. PMID:26686393.

JASTI J, FURUKAWA H, GONZALES EB, GOUAUX E. (2007). *Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH*. Nature. 2007 Sep 20;449(7160):316-23.PMID:17882215.

JENNER P. (2014). *An overview of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease*. Int. Rev. Neurobiol. 119 71–86. 10.1016/B978-0-12-801022-8.00003-9.

JIANG L.H., MACKENZIE A.B., NORTH R.A., SURPRENANT A. (2000). *Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors*. Mol Pharmacol. 2000 Jul;58(1):82-8.PMID:10860929.

JIMENEZ-PACHECO A., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., ARRIBAS-BLÁZQUEZ M., SANZ-RODRÍGUEZ A., OLIVOS-ORÉ L.A., ARTALEJO A.R., ALVES M., LETAVIC M., MIRAS-PORTUGAL M.T., CONROY R.M., DELAN-

TY N., FARRELL A., O'BRIEN D.F., BHATTACHARYA A., ENGEL T., HENSHALL D.C. *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.

JIMENEZ-PACHECO A., MESURET G., SANZ-RODRÍGUEZ A., TANAKA K., MOONEY C., CONROY R., MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., HENSHALL D.C., ENGEL T. *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.

JIN R., BANKE T.G., MAYER M.L., TRAYNELIS S.F., GOUAUX E. (2003). *Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors*. Nat Neurosci. 2003 Aug;6(8):803-10. PMID:12872125.

JOHNSON R.L., P.J. VAN HAASTERT, A.R. KIMMEL, C.L. SAXE, B. JASTORFF, P.N. DEVREOTES. *The cyclic nucleotide specificity of three cAMP receptors in Dictyostelium*. J. Biol. Chem., 267 (1992), pp. 4600-4607.

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 inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 18. pii: 201704847. doi: 10.1073/pnas.1704847114. [Epub ahead of print] PMID:28720702.

KAWATE T., MICHEL J.C., BIRDSONG W.T., GOUAUX E. (2009) *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*.

Nature. 2009 Jul 30;460(7255):592-8. doi: 10.1038/nature08198. PMID: 19641588.

KHAKH B.S., NORTH R.A. (2012) *Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS*. Neuron. 2012 Oct 4;76(1):51-69. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.024. PMID:23040806.

KING B.F., LIU M., PINTOR J., GUALIX J., MIRAS-PORTUGAL M.T., 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.

KIRYU-SEO S., KIYAMA H., (2011). *The nuclear events guiding successful nerve regeneration*. Front. Mol. Neurosci. 4, 53.

A. KLISHIN, N. LOZOVAYA, J. PINTOR, M.T. MIRAS-PORTUGAL, O. KRISHTAL (1994) *Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus*. Neuroscience 58 (2), 235-236 PMID:8152536.

KRIEGSTEIN, A., ALVAREZ-BUYLLA A. (2009). *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annual review of neuroscience 32: 149-84.

KÜGELGEN VON I. (2006). *Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes*. Pharmacol Ther. 2006 Jun;110(3):415-32. Epub 2005 Oct 28. Review. PMID:16257449.

KÜGELGEN VON I., HARDEN T.K. (2011) *Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors*. Adv Pharmacol. 2011;61:373-415. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6. PMID:21586365.

KUKULSKI, F., LÉVESQUE, S.A., LAVOIE, É.G. ET AL. *Purinergic Signalling* (2005) 1: 193. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>

LEÓN D., SÁNCHEZ-NOGUEIRO J., MARÍN-GARCÍA P., MIRAS-PORTUGAL M.A. (2007) *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.neuint.2007.12.004. Epub 2007 Dec 15.PMID:18242779.

LEÓN D., MARÍN-GARCÍA P., SÁNCHEZ-NOGUEIRO J., DE LA O F.O., GARCÍA-CARMONA F., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2007). *P2X agonist BzATP interferes with amplex-red-coupled fluorescence assays*. *Annual Biochem.* 2007 Aug 1;367(1):140-2. Epub 2007 PMID:17562321.

LEÓN D., HERVÁS C., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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-OTEGUI M., GÓMEZ-VILLAFUERTE R., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., MIRAS-PORTUGAL M.T., GUALIX J. (2011) *Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on α -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.

LOHMANN, K. 1929. *Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel*. *Naturwissenschaften* 17, 624–625.

LOIS C. and ALVAREZ-BUYLLA A. (1993). *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*, *PNAS*. 90: 2074-2077.

— (1994) *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. *Science*. ;264(5162):1145-8. PMID: 8178174.

LOIS C., GARCÍA-VERDUGO J.M. and ALVAREZ-BUYLLA A., (1996). *Chain migration of neuronal precursors*. *Science*. 271. 978-910.

LUSTIG K.D., SHIAU A.K., BRAKE A.J., JULIUS D. (1993) *Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5113–5117.

MALATESTA P., HACK M.A., HARTFUSS E., KETTENMANN H., KLINKERT W., KIRCHHOFF F., GÖTZ M. (2003). *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. *Neuron*. (5):751-64. PMID: 12628166.

MANSOOR S.E., LÜ W, OOSTERHEERT W., SHEKHAR M., TAJKHORSHID E., GOUAUX E. (2016). *X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action*. *Nature*. 2016 Oct 6;538(7623):66-71. doi: 10.1038/nature19367. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27626375.

MATEO J., ROTLLÁN P., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1996) *Suramin--a powerful inhibitor of neural ecto-diadenosine polyphosphate hydrolase*. *Br J Pharmacol*. 1996 Sep;119(1):1-. PMID: 887234.

— (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., GÓMEZ DE ARANDA I., SOLSONA C., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1997b) *Diadenosine polyphosphate hy-*

drolase from presynaptic plasma membranes of Torpedo electric organ. Biochem J. 1997 May 1;323 (Pt 3):677-84. PMID: 9169600.

MENÉNDEZ-MÉNDEZ A., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2015) *The vesicular nucleotide transporter (VNUT) is involved in the extracellular ATP effect on neuronal differentiation.* Purinergic Signal. 2015 Jun;11(2):239-49. doi: 10.1007/s11302-015-9449-4. Epub 2015 Apr 7. PMID:25847073.

MENÉNDEZ-MÉNDEZ A., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., ORTEGA F., GUALIX J., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., MIRAS-PORTUGAL M.T. *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.

MIRAS-PORTUGAL M.T., GUALIX J., PINTOR J. (1998) *The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates.* FEBS Lett. 1998 Jun 23;430(1-2):78-82. Review. PMID: 9678598.

MIRAS-PORTUGAL M.T., GUALIX J., MATEO J., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., CASTRO E., PINTOR J. (1999). *Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism.* Prog Brain Res. 1999;120:397-409. Review. PMID:10551014.

MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., GIRÁLDEZ L., HERVÁS C., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., SEN R.P., GUALIX J., PINTOR J. (2003). *P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells.* Neurochem Res. 2003 Oct;28(10):1597-605. PMID:14570406.

MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., ARTALEJO A.R., GUALIX J. (2015)

Role of P2X7 and P2Y2 receptors on α -secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation “in vivo” by P2X7 receptor. Comput Struct Biotechnol J. 2015 Mar 11;13:176-81. doi: 10.1016/j.csbj.2015.02.005. eCollection 2015. Review.PMID: 25848496.

MIRAS-PORTUGAL M.T., GÓMEZ-VILLAFUERTE R., GUALIX J., DÍAZ-HERNÁNDEZ J.I., ARTALEJO A.R., ORTEGA F., DELICADO E.G., PÉREZ-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 M.T., 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.

MOLINA-ARCAS M., CASADO F.J., PASTOR-ANGLADA M. (2009) *Nucleoside transporter proteins.* Curr Vasc Pharmacol. 2009 Oct;7(4):426-34. Review.

MORENTE V., PÉREZ-SEN R., ORTEGA F., HUERTA-CEPAS J., DELICADO E.G., MIRAS-PORTUGAL M.T. (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., RODRÍGUEZ-JIMENEZ, F.J., GARCÍA-ROSELLÓ, M., LAINEZ, S., ERCEG, S., CALVO, M.T., RONAGHI, M., LLORET, M., PLANELLAS-CASES, R., SANCHEZ-PUELLES, J.M., STOJKOVIC,

M., 2009. *Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function*. Stem Cells 27, 733e743.

MORIYAMA Y., HIASA M., SAKAMOTO S., OMOTE H., NOMURA M. (2017) *Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling*. Purinergic Signal. 2017 Sep;13(3):387-404. doi: 10.1007/s11302-017-9568-1. Epub 2017 Jun 14. Review. PMID:28616712.

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.

MÜLLER C.E., JACOBSON K.A. (2011). *Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs*. Biochim Biophys Acta. 2011 May;1808(5):1290-308. doi: 10.1016/j.bbame.2010.12.017. Epub 2010 Dec 23. Review. PMID:21185259.

NORTH RA. (2002). *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev. 2002 Oct;82(4):1013-67. Review. PMID:1227095.

OMURA S., CRUMP A. (2004). *The life and times of ivermectin - a success story*. Nat Rev Microbiol. 2004 Dec;2(12):984-9. PMID:15550944.

ORTEGA F., PÉREZ-SEN R., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2008) *Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons*. J Neurochem. 2008 Jan;104(1):62-73. Epub 2007 Nov 6. PMID: 17986231.

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

ORTEGA F., PÉREZ-SEN R., DELICADO E.G., TERESA MIRAS-PORTUGAL M. (2011). *ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y₁₃ and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons*. *Neuropharmacology.* 2011 Dec;61(8):1210-21. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.010. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21798274.

PANCHENKO V.A., PINTOR J., TSYNDRENKO A.Y., MIRAS-PORTUGAL M.T., KRISHTAL O.A.(1996) *Diadenosine polyphosphates selectively potentiate N-type Ca²⁺ channels in rat central neurons*. *Neuroscience.* 1996 Jan;70(2):353-60. PMID:8848145.

PANIAGUA-HERRANZ L., GIL-REDONDO J.C., QUEIPO M.J., GONZÁLEZ-RAMOS S., BOSCA L., PÉREZ-SEN R., MIRAS-PORTUGAL M.T., DELICADO EG. (2017). *Prostaglandin E₂ Impairs P2Y₂/P2Y₄ 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.

PÉREZ-SEN R., QUEIPO M.J., MORENTE V., ORTEGA F., DELICADO E.G., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2015). *Neuroprotection Mediated by P2Y13 Nucleotide Receptors in Neurons*. Comput Struct Biotechnol J. 2015 Feb 17;13:160-8. doi: 10.1016/j.csbj.2015.02.002. eCollection 2015. Review. PMID: 25750704.

PÉREZ-SEN R., GÓMEZ-VILLAFUERTES R., ORTEGA F., GUALIX J., DELICADO E.G., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2017). *An Update on P2Y13 Receptor Signalling and Function*. Adv Exp Med Biol. 2017;1051:139-168. doi: 10.1007/5584_2017_91. PMID: 28815513.

PINTOR J., DÍAZ-REY M.A., TORRES M., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1992a). *Presence of diadenosine polyphosphates-Ap4A and Ap5A-in rat brain synaptic terminals. Ca2+ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine*. Neurosci Lett. 1992 Mar 2;136(2):141-4. PMID:1641181.

PINTOR J., ROTLLÁN P., TORRES M., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1992b) *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., PORRAS A., MORA F., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1993) *Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from caudate putamen of conscious rat*. Neurosci Lett. 1993 Feb 5;150(1):13-6. PMID:8469395.

PINTOR J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1995a). *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.

— (1995b) *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 M.T. (1995c) *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, KING BF, MIRAS-PORTUGAL MT, BURNSTOCK G. (1996) *Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X2 and P2Y1 purinoceptors.* Br J Pharmacol. 1996 Nov;119(5):1006-12. PMID:8922753.

PINTOR J., GUALIX J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1997) *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., DÍAZ-HERNÁNDEZ M., BUSTAMANTE C., GUALIX J., DE TERREROS F.J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1999). *Presence of dinucleotide and ATP receptors in human cerebrocortical synaptic terminals.* Eur J Pharmacol. 1999 Feb 5;366(2-3):159-65.PMID:10082196.

QUEIPO M.J., GIL-REDONDO J.C., MORENTE V., ORTEGA F., MIRAS-PORTUGAL M.T., DELICADO E.G., 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.

RAISLEY B., ZHANG M.H., HERELD D., HADWIGER J.A. *A cAMP receptor-like G protein-coupled receptor with roles in growth regulation and development.* Dev Biol. 2004, 265: 433-445. 10.1016/j.ydbio.2003.09.035.

RAMÓN Y CAJAL, S. (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).

— (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*.

RODRÍGUEZ DEL CASTILLO A. (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.

ROSSOR M.N., GARRETT N.J., JOHNSON A.L., MOUNTJOY C.Q., ROTH M., IVERSEN L.L. (1982) *A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia*. Brain. 1982 Jun;105(Pt 2):313-30. PMID:7082992.

ROTLLÁN P., RAMOS A., PINTOR J., TORRES M., MIRAS-PORTUGAL M.T. (1991) *Di(1,N6-ethenoadenosine)5', 5'''-P1,P4-tetraphosphate, a fluorescent enzymatically active derivative of Ap4A*. FEBS Lett. 1991 Mar 25;280(2):371-4. PMID: 2013340.

SAFRA N., LING G.V., SCHAIBLE R.H., BANNASCH D.L. (2005). *Exclusion of urate oxidase as a candidate gene for hyperuricosuria in the Dalmatian dog using an interbreed backcross*. J Hered. 2005;96(7):750-4.

SÁNCHEZ-NOGUEIRO J., MARÍN-GARCÍA P., LEÓN D., LEÓN-OTEGUI M., SALAS E., GÓMEZ-VILLAFUERTE R., GUALIX J., MIRAS-PORTUGAL M.T. (2009) *Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors*. *Neurochem Int.* 2009 Dec;55(7):671-82. doi: 10.1016/j.neuint.2009.06.009. Epub 2009 Jun 26. PMID: 19560503.

Sautin Y.Y., Johnson R.J. (2008) *Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008 Jun;27(6):608-19. doi: 10.1080/15257770802138558. PMID:18600514.

SAWADA K., ECHIGO N., JUGE N., MIYAJI T., OTSUKA M., OMOTE H., YAMAMOTO A., MORIYAMA Y. (2008). *Identification of a vesicular nucleotide transporter*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15;105(15):5683-6.

SCHACHTER J.B., BOYER J.L., LI Q., NICHOLAS R.A., HARDEN T.K. (1997) *Fidelity in functional coupling of the rat P2Y1 receptor to phospholipase C*. *Br J Pharmacol* 122:1021–1024.

SEBASTIÁN-SERRANO Á., DE DIEGO-GARCÍA L., MARTÍNEZ-FRAILES C., ÁVILA J., ZIMMERMANN H., MILLÁN J.L., MIRAS-PORTUGAL M.T., DÍAZ-HERNÁNDEZ M. (2015). *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 L.A., ARRIBAS-BLÁZQUEZ M., MARTÍNEZ-FRAILES C., PÉREZ-DÍAZ C., MILLÁN J.L., ARTALEJO A.R., MIRAS-PORTUGAL M.T., HENSHALL D.C., 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.

SESMA J.I., KREDA S.M., OKADA S.F., VAN HEUSDEN C., MOUSSA L., JONES L.C., O'NEAL W.K., TOGAWA N., HIASA M., MORIYAMA Y., LAZAROWSKI E.R. (2013) *Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules.* Am J Physiol Cell Physiol. 2013 May 15;304(10):C976-84. doi: 10.1152/ajpcell.00371.2012. Epub 2013 Mar 6. Erratum in: Am J Physiol Cell Physiol. 2014 Feb 15;306(4):C415. PMID:23467297.

SHI, S. H., JAN, L. Y. and JAN, Y. N. (2003). *Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity.* Cell 112, 63-75.

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.

SHINOZAKI Y.¹, SUMITOMO K., TSUDA M., KOIZUMI S., INOUE K, TORIMITSU K.. (2009). *Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors.* PLoS Biol. 2009 May;7(5):e1000103. doi: 10.1371/journal.pbio.1000103. Epub 2009 May 5. PMID: 19419241.

SRIVASTAVA R., KUMAR M., PEINEAU S., CSABA Z., MANI S., GRESSENS P., EL GHOZZI V.. (2013). *Conditional induction of Math1 specifies embryonic stem cells to cerebellar granule neuron lineage and promotes differentiation into mature granule neurons.* Stem Cells. 2013 Apr;31(4):652-65. doi: 10.1002/stem.1295. PMID: 23225629.

TAKAHASHI K., YAMANAKA S.. (2006) *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.

TESSIER-LAVIGNE M., PLACZEK M. (1991) *Target attraction: are developing axons guided by chemotropism?* Trends Neurosci. 1991 Jul;14(7):303-10. PMID:1719678.

THOMPSON C.A. (2008). *FDA approves pharmacologic stress agent*. Am J Health Syst Pharm. 2008 May 15;65(10):890. doi: 10.2146/news080038. PMID:18463333.

VITART V., RUDAN I., HAYWARD C., GRAY N.K., FLOYD J., PALMER C.N., KNOTT S.A., KOLCIC I., POLASEK O., GRAESSLER J., WILSON J.F., MARINAKI A., RICHES P.L., SHU X., JANICIJEVIC B., SMOLEJ-NARANCIC N., GORGONI B., MORGAN J., CAMPBELL S., BILOGLAV Z., BARAC-LAUC L., PERICIC M., KLARIC I.M., ZGAGA L., SKARIC-JURIC T., WILD S.H., RICHARDSON W.A., HOHENSTEIN P., KIMBER CH, TENESA A., DONNELLY L.A., FAIRBANKS L.D., ARINGER M., MCKEIGUE P.M., RALSTON S.H., MORRIS A.D., RUDAN P., HASTIE N.D., CAMPBELL H., WRIGHT A.F. (2008) *SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout*. Nat Genet. 2008 Apr;40(4):437-42.

WEBB T.E., SIMON J., KRISHEK B.J., BATESON A.N., SMART T.G., KING B.F., BURNSTOCK G., BARNARD E.A. (1993) *Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor*. FEBS Lett 324:219–225.

XU L., SHI Y., ZHUANG S., LIU N. *Recent advances on uric acid transporters*. Oncotarget. 2017 Aug 10;8(59):100852-100862. doi:

10.18632/oncotarget.20135. eCollection 2017 Nov 21. Review.
PMID: 29246027.

YAMADA R.X., 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.

ZHANG K., ZHANG J., GAO Z.G., ZHANG D., ZHU L., HAN G.W.,
MOSS S.M., PAOLETTA S., KISELEV E., LU W., FENALTI G., ZHANG
W., MÜLLER C.E., YANG H., JIANG H., CHEREZOV V., KATRITCH V.,
JACOBSON K.A., STEVENS R.C., WU B., ZHAO Q. (2014) *Structure
of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug.*
Nature. 2014 May 1;509(7498):115-8. doi: 10.1038/nature13083.
Epub 2014 Mar 23. PMID:24670650.

ZHANG J., ZHANG K., GAO Z.G., PAOLETTA S., ZHANG D., HAN
G.W., LI T., MA L., ZHANG W., MÜLLER C.E., YANG H., JIANG H.,
CHEREZOV V., KATRITCH V., JACOBSON K.A., STEVENS R.C., WU B.,
ZHAO Q. (2014) *Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor.*
Nature. 2014 May 1;509(7498):119-22. doi: 10.1038/nature13288.
PMID:24784220.