

REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA

**RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS
Y SU IMPLICACIÓN EN LOS
MECANISMOS DEL DOLOR Y LA
ANALGESIA**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE INGRESO DEL
ACADÉMICO CORRESPONDIENTE
EXCMA. SRA. DOÑA M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

CELEBRADO EL DÍA 19 DE MAYO DE 2014

PRESENTACIÓN
A CARGO DEL ACADÉMICO NUMERARIO
EXCMO. SR. DON JOAN GUINOVART CIRERA



BARCELONA 2014

ISBN: 978-84-942290-2-2
Depósito legal: M. 12.726-2014

Imprime: REALIGRAF, S. A.
Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

La Academia no se solidariza con las opiniones que se exponen en esta publicación de las cuales es responsable el autor.

DISCURSO DE PRESENTACIÓN

A cargo del Académico numerario

Excelentísimo Sr. Don Joan Guinovart Cirera

Excel·lentíssim Senyor President de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya,
Molt Il·lustres Senyores i Senyors acadèmics,
Digníssimes autoritats,

Senyores i Senyors,

Com a membre de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, tinc el privilegi de fer la presentació de l'acadèmica corresponent electa, la Dra. María Teresa Miras Portugal. Aquesta tasca és per mi un gran plaer ja que, encara que els seus mèrits i trajectòria vital siguin ben coneguts de tots vostès, l'ocasió em permetrà posar de manifest la brillant trajectòria científica de la nova acadèmica.

La Dra. María Teresa Miras va néixer a Carballino, Galícia. Encara ressona a les seves oïdes la frase centenars de vegades repetida pel seu pare quan la veia afanyada en aquelles labors primoroses que feien les nenes: “deixa això i agafa un llibre”. Els seus pares van aconseguir que la lectura i l'observació de la naturalesa fossin passió, que s'ha incrementat amb el temps, i la base de la seva formació.

Era l'octubre de 1965 quan Maria Teresa va creuar per primera vegada el llindar del Palau de Fonseca, la històrica facultat de farmàcia de Santiago de Compostel·la. Allà va rebre el seu baptisme universitari i va quedar enlluernada només entrar pel claustre de granit gris, que atresorava la bellesa i tendresa dels rododendres i les azalees de color rosa quan florien a la primavera. Santiago i la seva universitat plural la van fer persona universal i sense por.

La María Teresa pertanyia a l'equip d'handbol i a un grup de teatre universitari. Va arribar a representar O'Neill, en una obra titulada *Dreamy Kid*, fent d'Irene, i Anton Txèkhov, no pas en l'obra *El jardí*

dels cirerers, sinó en una de molt modesta, en un únic acte, titulada *Una proposta de matrimoni*. Tot i que l'aplaudien moltíssim, va deixar l'esport i el teatre per a dedicar-se a la docència i investigació, que era el que realment l'atreia. Santiago, lloc d'arribada dels pelegrins, es va convertir, per ella, en punt de partida on se li van enfortir les ales que li van permetre volar. Després de passar-hi tres anys, va traslladar-se a la Universitat Complutense. Venint de Compostel·la, Madrid li va semblar molt dogmàtica i bastant tancada, faltada de llibertat mental, fins i tot a la universitat. Va acabar la carrera de farmàcia amb unes notes brillantíssimes. Va obtenir el Premi Extraordinari de Llicenciatura, el Premi Nacional Fi de Carrera, el “Lazo de Alfonso X el Sabio” i el “Víctor de Plata”.

Amb aquest bagatge, se'n va anar a fer la tesi doctoral al Centre de Neuroquímica d'Estrasburg. En aquell moment era el lloc on es trobaven els investigadors de neurociència d'arreu del món. Estava dirigit per un prestigiós neurocientífic, el professor Paul Mandel. Allà va aprendre l'exercici de la racionalitat cartesiana, l'obligat respecte i dissecció analítica de les idees alienes i a no subestimar la qualitat de les idees pròpies. La Dra. Miras va quedar atrapada per sempre més, captivada per la bellesa de les neurones i la subtileza amb què utilitzen els compostos neurotransmissors per a comunicar-se. Estrasburg va suposar un gran canvi. Va interactuar amb els millors científics i va viure en directe una sèrie de descobriments de gran calat i transcendència, com la demostració dels introns efectuada per Pierre Chambon.

Va tornar a Espanya amb el títol de Doctora sota el braç el setembre de 1975, un any clau de la nostra història recent. Va començar a treballar en el departament de bioquímica de la facultat de farmàcia de Madrid, dirigit pel prestigiós professor Ángel Santos Ruiz, seguint la línia que havia començat a Estrasburg. Tres anys més tard, obtingué una plaça de professora titular en el departament de bioquímica de la facultat de medicina de la Universitat Autònoma de Madrid, dirigit per un altre gran investigador, el professor Alberto Sols. Ja amb el seu propi laboratori, en un entorn excel·lent, va començar a reflexionar sobre quina direcció havia de prendre la seva investigació. En el tema sobre el qual estava treballant, el dels neurotransmissors aminèrgics, hi havia molts grans científics i centres d'un potencial enorme, amb els quals

hauria de competir. Va adonar-se que fóra molt difícil fer-hi aportacions originals i significatives, tant és així que va esdevenir conscient que si volia triomfar havia de trobar una línia nova i única, un tema que ningú ni tan sols hagués pensat. Confessa que en aquell moment la va ajudar un vers de Walt Whitman:

Enjoy the panic that leads you have life ahead. Live intensely, without mediocrity.

Think that you are the future and facing the task with pride and without fear.

Havia de començar alguna cosa nova, tot controlant el pànic a l'inconegut, el vertigen de la llibertat. Passava moltes hores rumiant possibilitats i un dia, en sortir de la biblioteca a Madrid, ho va veure clar i va trobar la Via Làctia que la guiaria en el seu nou i llarg pelegrinatge. Feia poc que s'havia descobert que les vesícules neuronals del cervell i les glàndules secretores contenien nucleòtids i dinucleòtids. La pregunta que es va plantejar com a futur tema del seu treball era si els dinucleòtids i nucleòtids podien ser neurotransmissors per dret propi. I va resultar que sí!

Va ser i segueix sent un viatge iniciàtic, un pelegrinatge que li durarà tota la vida, i que és la seva vida. El poeta d'Ourense, Xosé Ángel Valente, ho descriu així:

***“...pues también está escrito que el que sube
hacia ese sol no puede detenerse
y va de comienzo en comienzo
por comienzos que no tienen fin”.***

Si un camí és bo, en poc temps passa a estar molt transitat i una multitud segueix els pioners. Ara són molts els que treballen en aquest camp, i la neurotransmissió purinèrgica mitjançant nucleòtids és una de les àrees més fèrtils de la neurociència. La Dra. Miras va organitzar laboratoris i grups de treball sobre aquest tema a totes les universitats per les quals ha anat passant: la Universitat Autònoma de Madrid, la Universitat de Múrcia i la Universitat Complutense de Madrid, de la

qual és catedràtica des de l'any 1986. Les seves investigacions han estat finançades per organismes europeus, nacionals i, més recentment, per fundacions privades. Així, ha pogut competir amb els millors grups de més enllà de les fronteres. Ha format un gran nombre de científics, als quals ha inculcat la il·lusió per la recerca i la capacitat de qüestionar els resultats i buscar noves interpretacions. Podem considerar l'escola creada per la Dra. Miras com una de les més influents en l'àmbit de les neurociències.

Ara la seva galàxia és un jardí on planta les neurones. Per ella cada neurona és una estrella, i està envoltada de planetes, que són els transmissors, per poder parlar l'una amb l'altra. Moltes neurones es parlen amb els nucleòtids, i poden ser cridaneres o callades. A més, ara sabem que els nucleòtids promouen la supervivència de les neurones i que són necessaris en l'etapa embrionària. Aquests compostos, valent-se dels receptors descoberts pel seu grup, indueixen connexions neuronals i afavoreixen la formació de la gran xarxa que és el nostre cervell. No hi ha dubte que són una de les dianes farmacològiques sobre les quals més s'està treballant i per a les quals es llicencien més patents en l'àmbit de la neurociència, i també en el cardiovascular i el de la inflamació.

La Dra. Miras ha vist reconeguda la seva colossal contribució amb nombrosos premis i distincions. Destaquem els premis María Josefa Wonenburger de la Xunta de Galícia i Miguel Catalán de la Comunitat de Madrid. És Acadèmica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, de la qual va ser presidenta. També pertany a la Real Academia de Ciencias Veterinarias, L'Académie Nationale de Pharmacie de France i l'Acadèmia Europea. L'any 2013 va ser investida Dra. Honoris Causa per la Universitat Rey Juan Carlos de Madrid.

La Dra. Miras ha tingut un gran suport en la seva família, on ha trobat ajut i comprensió. La presència de seu marit Fernando Varela, sempre original i creatiu, i gran matemàtic, ha aportat la plenitud i el valor dels números a la seva vida. La seva millor obra conjunta són els seus fills Fernando i Alberto.

Els seus poetes predilectes són Quevedo, Rosalía de Castro i Baudelaire. Recentment ha descobert el gran dibuixant i filòsof de

vinyetes Miguelanxo Prado que, per cert, treballa entre Barcelona i La Corunya, i col·lecciona el seus llibres. Les seves plantes predilectes són les camèlies, en té unes 20 varietats que ha plantat al seu jardí de Galícia, unes 40 plantes en total.

Qualsevol que conegui a la Dra. Miras sabrà que és constructiva, somiadora, i que mai no ha perdut la il·lusió de la feina ben feta. Crec que la defineix molt bé un poema que la seva admirada Rosalía va escriure en castellà.

*Hay canas en mi cabeza, hay en los prados escarcha,
Mas yo prosigo soñando, pobre, incurable sonámbula,
Con la eterna primavera de la vida que se apaga
Y la perenne frescura de los campos y las almas,
Aunque los unos se agostan y aunque las otras se abrasan.*

Finalment, afegir que la Dra. Miras és una gallega universal. A les universitats i als centres d'investigació pels quals ha passat al llarg de la seva vida, sempre s'ha sentit ciutadana del món, sense complexos ni pors, sabent que hom ha de construir cada moment del present sense enyorança, sigui on sigui. Aquesta idea d'universalitat la va adquirir als seus anys d'estudiant a Fonseca. És per això, n'estic segur, que s'incorporarà plenament a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, i li desitjo que el seu camí entre nosaltres sigui llarg i venturós.

Moltes gràcies.

**RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS Y
SU IMPLICACIÓN EN LOS MECANISMOS
DEL DOLOR Y LA ANALGESIA**

DISCURSO

**Leído en el acto de ingreso del Académico
Correspondiente**

Excma. Sra. Doña M.^a Teresa Miras Portugal

Celebrado el día 19 de mayo de 2014

...i nosaltres acollim somrients el coratge
dels qui confien que hi haurà demà.

(Salvador Espriu. El llibre de la bona gent.)

*(...y nosotros acogemos sonrientes el coraje
de quienes confían en que habrá un mañana.*

(Salvador Espriu. El libro de la buena gente.)

Excelentísimo Señor Presidente de la Real Academia de Farmacia de
Cataluña.

Excmas. Señoras y Señores Académicos.

Señoras y señores.

Agraïments

Vull començar agraint al Excel·lentíssim Senyor President de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, i amic, Dr. Josep Ventura, i als il·lustres membres d'aquesta institució, especialment als pertanyents a la Secció 2.^a, Ciències Biològiques i Biotecnologia, per proposar i recolzar la meva candidatura com a membre corresponent d'aquesta noble i prestigiosa acadèmia envers la qual sento un gran respecte. Voldria també deixar constància de l'afecte personal i admiració professional per l'anterior president, l'Il·lm. Sr. Miquel Ylla-Catalá i Genís, que va portar el timó d'aquesta acadèmia amb gran saviesa i prudència durant els mandats anteriors. El meu agraïment és encara major donat que també va ser membre d'aquesta institució el meu predecessor en la presidència de la Real Academia Nacional de Farmacia, l'Excm. Sr. Juan Manuel Reol Tejada, que admirava la Reial Acadèmia de

Farmàcia de Catalunya i tenia grans amics entre els seus membres, amics lleials i sincers que el van acollir. Amics que es reconeixien entre si pel fet de ser sempre dels que construeixen, gent amb coratge dels que confien que hi haurà un demà, com diuen els versos del gran poeta català Salvador Espriu: *i nosaltres acollim somrients el coratge dels qui confien que hi haurà demà*. El demà existirà si som conscients que hem de construir-lo avui.

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo al Sr. Presidente y amigo, el ilustrísimo Sr. Dr. Josep Ventura, y a los ilustres miembros de esta institución, especialmente los pertenecientes a la Sección 2.^a: Ciencias Biológicas y Biotecnología por proponer y apoyar mi candidatura como miembro correspondiente de esta Noble y Prestigiosa Academia por la que siento un gran respeto. Quisiera también dejar constancia del afecto personal y admiración profesional por el anterior presidente Ilmo. Sr. Don Miquel Ylla-Catalá i Genis, quien llevó el timón de esta Academia con gran sabiduría y prudencia en los anteriores mandatos. Mi agradecimiento es todavía mayor pues también fue miembro de esta Institución mi predecesor como Presidente en la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, quien admiraba a la Real Academia de Farmacia de Cataluña y tenía grandes amigos entre sus miembros, amigos leales y sinceros que le acogieron. Amigos que se reconocían entre sí por ser siempre de los que construyen, gente con coraje de los que confían en que habrá un mañana, como dicen los versos del gran poeta catalán Salvador Espriu: *i nosaltres acollim somrients el coratge dels qui confien que hi haurà demà*. El mañana existirá si somos conscientes de que tenemos que construirlo hoy.

Agradezco al Excmo. Sr. Don Joan Guinovart su afectuosa presentación, que se debe sin duda a los muchos años siendo compañeros y amigos en todas las batallas de la Bioquímica y la Biología Molecular en España y algunas fuera de las fronteras. Joan muchas gracias por tus exagerados elogios.

De igual modo cuando uno avanza en ciencia lo hace siendo consciente de que debe mucho a mucha gente: los maestros que nos han enseñado, los compañeros de clase y laboratorio con los que se discutía y aprendía por “ósmosis”, los propios discípulos que nos han demostrado que en ciencia todo avanza de modo vertiginoso, que requiere de neuronas jóvenes e intrépidas y que es ley de vida necesaria la renovación de los cerebros. Además los que tenemos el privilegio de ser docentes y transmitir el conocimiento a los más jóvenes nos enfrentamos cada día al reto de modelar el futuro de forma responsable y ellos nos enseñan el camino.

Para terminar permítanme dejar constancia de que a lo largo de mi vida ha habido una constante absoluta, que ha sido sin lugar a dudas la presencia de mi esposo, Fernando Varela, gran matemático, compañero fiel, siempre a mi lado, animándome para avanzar, animándome para adquirir nuevos compromisos y compartiendo lo mejor de nuestras vidas, nuestros hijos Fernando y Alberto, de los que nos sentimos legítimamente orgullosos.

Gracias por aceptarme entre ustedes y me siento muy honrada al pertenecer a tan noble institución.

RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS Y SU IMPLICACIÓN EN LOS MECANISMOS DEL DOLOR Y LA ANALGESIA

“La oscuridad nos envuelve a todos, pero mientras el sabio tropieza con alguna pared, el ignorante permanece tranquilo en el centro de la habitación” (Anatole France).

1. INTRODUCCIÓN

1.a) Elección del tema

La elección del tema de este discurso de entrada no fue fácil. Solamente tenía clara una cosa, no hablar de lo que no entiendo o desconozco, véase: de política, incluida la científica, ya que no soy mínimamente capaz de comprenderla, en legislación y predicciones tampoco soy experta y así por eliminación, me quedaba solamente disertar sobre una parcela del conocimiento donde llevo muchos años trabajando: El área de señalización purinérgica neural y dentro de ella la señalización mediada por nucleótidos. Como el área es muy amplia decidí centrarme en la búsqueda de nuevas dianas contra el dolor que pertenecen a los receptores de nucleótidos. Área extraordinariamente fértil y novedosa dentro de la farmacología antinociceptiva.

En el área de investigación purinérgica, junto con mi grupo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, hemos encontrado nuevos transmisores nerviosos, nuevos receptores para nucleótidos, nuevas funciones, nuevas posibilidades para la farmacología

y el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de patologías nerviosas. En este largo recorrido de 40 años de investigación, ha habido muchas alegrías, muchas penas, muchas euforias, muchas rabietas y sobre todo muchos compañeros de viaje cargados de ilusión y tan ingenuos como yo misma.

No niego que alguna vez en esa búsqueda del descubrimiento científico, me sentí abandonada y maltratada por algunos esquivos receptores, que cruelmente y con cicatería escondían su importancia y su belleza a mis experimentos. Recordé más de una vez el hermoso poema de Pero da Ponte poeta gallego del siglo XIII:

Si eu poidera desamar / *(Si yo pudiera no haber amado*
a quen me sempre desamou / *A quien nunca me amó)*

Pero los investigadores somos inaccesibles al desaliento y basta un tímido guiño por parte del enzima/receptor, o cascada señalizadora de turno para que nuestro corazón acelere el ritmo y nos atrape de nuevo el frenesí por arrancarle a la vida una chispa de sus secretos.

Procedo de este modo a iniciar mi discurso de entrada como Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña que he titulado: *Receptores de nucleótidos y su implicación en los mecanismos del dolor y la analgesia*.

1.b) Introducción aspectos generales

Como farmacéuticos la búsqueda de remedios para fines precisos tiene en el dolor, y como aliviarlo, su origen primigenio y ha sido uno de los caminos más fructíferos en el desarrollo de nuestra profesión.

No podemos olvidar que uno de los lugares comunes en nuestra experiencia vital es la sensación dolorosa. Sus posibilidades son múltiples, incluyendo la que expresaba don Francisco de Quevedo: “*Mejor es que duela el cuerpo, no el alma*”. Como el dolor del alma es una

adquisición cultural y difícilmente medible, me centraré en el del cuerpo.

La realidad es que el dolor tiene múltiples posibilidades en su origen, sus características, su tratamiento, etc. Entre todos el mejor conocido es el dolor agudo. Es un aviso que dispara la alerta y nos protege en situaciones peligrosas para nuestra integridad física. Es un dolor localizado y transitorio que dispara una respuesta directa al estímulo. El calor excesivo, el efecto mecánico, o los compuestos químicos irritantes tienen en común el que requieren de un umbral de estimulación relativamente alto.

Desde los tiempos del Imperio Romano el dolor se ha relacionado con la inflamación, siendo definido por los cuatro síntomas: *calor, dolor, rubor y tumor*. La potencialidad terapéutica de los antiinflamatorios no esteroideos en el tratamiento del dolor ha sido y sigue siendo una de las bases de la farmacología actual.

El dolor persistente y crónico típico de estados inflamatorios o derivado de neuropatías es en el que se centran la mayor parte de las investigaciones y recursos en esta área. En la actualidad, el dolor sigue siendo un serio problema de salud que afecta la calidad de vida de millones de personas. No todas las causas del dolor son conocidas y el estudio de la sensación dolorosa y sus consecuencias siguen siendo en muchos casos problemas abiertos, que ocultan sus bases moleculares a la ciencia. Se estima que un tercio de la población mundial sufre de dolor persistente o recurrente y que los tratamientos no son satisfactorios en un porcentaje que puede alcanzar incluso el 50% en algunos tipos de dolor.

Una visión simplista del dolor lo contempla como una entidad estática, en donde las fibras, poco mielinizadas fibras A de tamaño medio y las no mielinizadas C, transmiten los impulsos dolorosos a la medula espinal, información que va primero al tálamo, antes de alcanzar el cortex somatosensorial. Hoy en día la visión que tenemos del dolor es mucho más compleja y tiene en cuenta los descubrimientos hechos en muy diversas disciplinas, desde la genética a las neurociencias y la inmunología.

La biología molecular y sus técnicas han permitido la identificación de los receptores periféricos noniceptivos y cuajar una visión más realista de los diferentes mecanismos de captación de la señal dolorosa y sus variantes. El conocimiento de los tipos de receptores periféricos y los mecanismos mediante los cuales inician la señalización dolorosa es un buen punto de partida para combatirlo. Las bases fisiopatológicas del dolor y como alcanzan el sistema nervioso central es otra área apenas explorada y mucho más compleja de lo que se suponía ya que el dolor modifica las propias conexiones sinápticas, lo que es conocido como plasticidad y su comprensión es esencial en el dolor crónico.

A todos los problemas genuinamente científicos en el estudio del dolor y su tratamiento se ha unido uno nuevo, la polémica que envuelve la utilización de animales de experimentación, sin olvidar que todavía nos queda por definir la equivalencia entre las sensaciones humanas y las de los animales.

2. PROBLEMAS EN LA VALIDACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS Y NUEVAS DIANAS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Actualmente los fármacos disponibles para el tratamiento del dolor, sea crónico o agudo pertenecen a dos grandes grupos, uno el de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) que actúan inhibiendo las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, cuyo primer ejemplo fue la Aspirina, y el otro los agonistas de los receptores de opiáceos, cuyo primer ejemplo fue la morfina. La FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos en una reciente comisión de estudio dio la voz de alarma por la administración de numerosos fármacos, como antidepresivos, antiepilépticos y compuestos de naturaleza esteroídica, entre otros muchos para el tratamiento del dolor de un gran número de enfermedades que encuentran poco alivio en los medicamentos clásicos. Entre estas están el cáncer, la diabetes, el SIDA, la artritis, etc..., y la comisión de la FDA planteó una pregunta muy simple: ¿Cómo es posible que después de tantos años de investigación exitosa y de múltiples dianas propuestas, solo sigan validados los medicamentos

que actúan sobre dos dianas: uno un enzima y el otro un receptor? Una importante conclusión de este estudio y relativamente obvia fue que se estaban empleando la infraestructura y los modelos del siglo pasado para la evaluación de nuevos compuestos del siglo XXI. Los modelos empleados para estudiar y autorizar el empleo de nuevos analgésicos son muy escasos y fueron desarrollados a mediados del siglo XX para validar los prototipos de compuestos ya mencionados, los antiinflamatorios no esteroideos y los opioides. Es probable que solamente se den como validos aquellos que se les asemejan.

2.a) Nuevos modelos de validación de analgésicos

Los animales como es el caso de los roedores no pueden describir la intensidad del dolor que están sufriendo, por lo tanto los investigadores se han apoyado históricamente en el estudio de los actos reflejos sencillos de analizar, como es el de lamerse las patas inflamadas o arquear la cola en respuesta al calor. Estos dolores agudos relacionados con una alteración sensorial brusca son difíciles de correlacionar con el dolor persistente en humanos que genera ansiedad en su contexto emocional. Según Mogil, “hay un abismo entre los síntomas clínicos del dolor en humanos y nuestras medidas en los modelos animales actuales” (Mogil, 2011). Este investigador propone que se establezca una escala catalogada de expresiones faciales para medir el dolor en los animales, correlacionando los gestos que se corresponden con los humanos. La idea de estudiar las emociones animales se remonta a Charles Darwin quien incluso les dedicó un libro (Darwin, 1872) y son características no solo de los animales sino también de los humanos recién nacidos y de corta edad y empleados para evaluar su dolor.

Una nueva corriente de opinión respecto a la crueldad de los modelos animales para estudiar nuevos fármacos analgésicos, surge de los propios animales de compañía que sufren enfermedades dolorosas. En los primeros ensayos de sustancias potencialmente medicamentosas, fueron los humanos y los animales de la familia o del entorno próximo a los que se administraban los compuestos a ensayar. Dado la multitud de posibles fármacos que era necesario analizar no quedó más remedio

que buscar animales más pequeños como el ratón y la rata para ensayarlos. Ahora, el grupo del Dr. Lascelles de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida sugiere darle la vuelta y que las mascotas que espontáneamente desarrollan la misma enfermedad que los humanos sirvan para el estudio de los nuevos analgésicos que finalmente servirían para los humanos. Por ejemplo, los caballos de carreras desarrollan dolores musculoesqueléticos, los gatos tienen una alta incidencia de degeneración articular y la gran mayoría de los perros desarrolla osteoartritis cuando envejecen. El ensayo de nuevos compuestos en estos animales a los cuales finalmente se les sacrifica debido a su enfermedad natural, podría ampliar el alcance y la fiabilidad de nuevos fármacos (Robertson and Lascelles, 2010). Muchos investigadores creen que estudiar el dolor que de modo natural ocurre en nuestras mascotas es más aceptable que estudiar el dolor provocado en animales de laboratorio. Excelentes comentarios y opiniones han sido recogidos en sendos editoriales de la revista Nature (Elie Dolgin, 2010 a y b).

2.b) Nuevas dianas para el tratamiento del dolor

La percepción consciente del dolor requiere un sistema nervioso central intacto y cuando se instaura el dolor crónico se producen cambios evidentes en el sistema nervioso central. El bloqueo de la señal nociceptiva en la entrada al sistema nervioso puede apaciguar o atenuar en gran medida el dolor, indicando la importancia de la señalización periférica para mantener el dolor crónico. El dolor generalmente comienza con la activación de los receptores sensitivos presentes en las estructuras somáticas o viscerales, los cuales reciben el nombre de nociceptores y dirigen la información al sistema nervioso central, SNC. El bloqueo o reducción de su señalización hacia el SNC puede atenuar o aliviar las complejas consecuencias sensitivas y emocionales, tanto en los casos de dolor agudo como en el dolor crónico.

Un gran número de nociceptores han sido clasificados en las terminales nerviosas aferentes, todos ellos con posibilidades para convertirse en dianas para nuevos analgésicos, comentaremos algunos de ellos para posteriormente centrarnos en los receptores de nucleótidos.

Los canales sensibles a ácido, ASIC1, ASIC2 y ASIC3, son canales evolutivamente muy primitivos y con una estructura cuaternaria trimérica y similar a los receptores de nucleótidos P2X. Los canales ASIC se encuentran en las terminales aferentes de las vísceras y en algunas terminaciones cutáneas. Son responsables de la señalización de las distensiones en el sistema gastrointestinal. Tienen un papel relevante en el dolor inducido por la isquemia y originan hipersensibilidad muscular.

Especial atención merecen los canales TRP, y dentro del grupo los TRPV estos relacionados en mayor o menor grado con la sensación de temperatura. Destacar entre ellos el TRPV1 que es estimulado directamente por el incremento de temperatura y esencial para la hiperalgesia termal asociada con la mayor parte de lesiones tisulares. Puede ser modulado directamente por protones, ácidos grasos derivados del araquidónico y por los vanilloides. Han demostrado claramente un papel relevante en la hipersensibilidad térmica.

El TRPV2, que aunque activado por la temperatura su función como nociceptor no está suficientemente demostrada. El TRPV3 también es activado por la temperatura, aunque su presencia en la fibras aferentes es dudosa, la activación con un agonista selectivo, el farnesil pirofosfato, incrementa la sensación nociceptiva. El TRPV4 también directamente activado por estímulos de temperatura tiene no obstante un papel prominente en la mecano transducción y es esencial en la hipersensibilidad en inflamación y lesión nerviosa.

Los TRPA1, son importantes ya que son activados directamente por una serie de sustancias químicas peligrosas, aceite de mostaza, aldehídos varios, acroleína, formalina etc... Son esenciales en la hipersensibilidad inducida por compuestos químicos. Recientemente se ha descubierto una sustancia natural volátil, la Umbellulona, que es un poderoso agonista del TRPA1. Esta cetona ha sido aislada de las hojas de la *Umbellularia Californica*, arbusto conocido con el nombre vulgar de laurel de California. El TRPA1 es un receptor abundante en las neuronas somatosensoriales, en donde al ser activado masivamente produce la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, el CGRP. Este péptido es el vasodilatador más poderoso de nuestro organismo y asociado con los dolores de cabeza profundos,

la clásica y temible migraña, ya que causa una masiva vasodilatación del sistema vascular en diversas áreas cerebrales, incluido el nervio trigémino (Nassini et al., 2012).

El TRPM8, que es activado directamente por el mentol y se ha demostrado su función en la hipersensibilidad al frío.

Dentro del grupo de los receptores de neurotransmisores clásicos, señalar algunos de ellos. En primer lugar los receptores ionotrópicos de serotonina, los 5-HT₃, se encuentran en un subgrupo de aferentes nociceptivas que son muy abundantes en la transmisión del dolor visceral (Camilleri, 2010).

Los receptores nicotínicos, que son los receptores ionotrópicos de acetilcolina, están presentes en los ganglios de las astas dorsales (DRG) de la médula espinal y también a nivel de las terminales en el sistema nervioso central, sus niveles se incrementan con la lesión nerviosa, solamente un subgrupo de subunidades estarían implicadas. Los agonistas epibatidina y nicotina tienen efectos antinociceptivos, sobre todo a nivel central (Rau et al., 2005). Múltiples trabajos de nuestro grupo han venido demostrando reiteradamente que en terminales sinápticas centrales los receptores nicotínicos presinápticos están colocalizados con los receptores ionotrópicos presinápticos de ATP y de dinucleótidos (Díaz-Hernández et al., 2001; 2002a; 2004; 2006).

Múltiples receptores de glutamato de naturaleza ionotrópica que expresan los subtipos GluR1-5 y NR1-2 han sido propuestos como elementos nociceptores a nivel periférico, pero la mayor evidencia de su función ha sido obtenida a nivel de las sinapsis centrales (Carlton and Coggeshall, 1999).

El GABA es sin duda uno de los compuestos estrella actuando sobre receptores ionotrópicos de los que existe un gran número de subtipos GABA-A gracias a las diversas subunidades que integran el receptor que posee una estructura pentamérica, lo mismo que la de los receptores nicotínicos. Su presencia es muy abundante en cerebro y una vez activado produce la hiperpolarización de las membranas al incrementar el flujo del ion cloruro al interior neuronal, lo que reduce la

percepción de señales estimuladoras, al ser requerido un mayor umbral de activación. Otro receptor de GABA importante en la modulación de la señal dolorosa es el metabotrópico GABA-b acoplado a la proteína G_i , muy abundante en la zona presináptica de las terminales centrales. El receptor GABA_b es un modulador muy eficiente sobre la respuesta ionotrópica de los receptores ionotrópicos presinápticos de ATP y dinucleótidos, pudiendo incrementar no solamente la respuesta máxima sino también la afinidad por los agonistas nucleotídicos (Gómez-Villafuertes et al., 2001).

Un apartado especial merecen los canales iónicos que mantienen el gradiente de membrana, los de sodio, calcio y potasio que con sus múltiples variantes han sido también objeto de un estudio sistemático, no olvidemos que los anestésicos locales actúan esencialmente sobre los canales de sodio.

La existencia de familias de faquires en la India y Pakistán con insensibilidad al dolor, llevo a un descubrimiento crucial relacionando la percepción del dolor con un subtipo especial de canales de sodio, en el año 2006. El grupo del Dr. Woods del Departamento de Genética Médica de los laboratorios Wellcome/MRC de Cambridge, publicó en la revista Nature una nueva canalopatía congénita del canal de sodio, Na(v)1.7, codificado en el gen SCN9A, cuyos portadores han perdido la capacidad de experimentar el dolor. El hallazgo se produjo estudiando el genoma de tres familias pakistaníes en los cuales la subunidad α del canal de sodio operado por voltaje Na(v)1.7, el cual se expresa abundantemente en las neuronas nociceptoras (Cox et al., 2006). Este canal presentaba anomalías funcionales y sus portadores eran insensibles al dolor, pudiendo infligirse profundas lesiones o perforaciones de su piel o lengua sin aparente dolor.

Otros canales de calcio y de potasio también están implicados en la señalización nociceptiva y hay incluso nuevos compuestos en fase 3 de ensayo en donde ciertos subtipos de canales de calcio son las nuevas dianas validadas.

Tampoco podemos olvidar las grandes expectativas abiertas con los receptores de cannabinoides, con compuestos licenciados como fármacos.

He dejado para el final los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de nucleótidos, P2X y P2Y, que junto con los receptores de adenosina son actualmente objeto de una investigación en profundidad por la variada localización y múltiples funciones tanto en el sistema nervioso central y periférico cómo en el cardiovascular e inmune, a ellos dedicaremos el apartado 3.

2.c) Medicamentos licenciados para el tratamiento del dolor en las últimas dos décadas 1990-2010: La cruda realidad

El inmenso trabajo experimental y la calidad de sus resultados contrastan con la escasa disponibilidad de nuevos medicamentos analgésicos. Este hecho queda patente en una reciente publicación de la Pain Research Unit de los laboratorios farmacéuticos Pfizer. En esta publicación se hace hincapié en la posibilidad de utilizar nuevos compuestos, o cambios en las modalidades de administración, pero sobre todo en la necesidad de innovar en el tratamiento del dolor crónico y la de validar nuevas dianas (Burgess and Williams, 2010).

Es de destacar que entre 1990 y 2010 han sido aprobadas para el tratamiento del dolor por la FDA un total de 54 especialidades farmacéuticas, de las cuales 31 están basadas en nuevos modos de formulación de opiáceos, antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), etc... Otras 19 especialidades basadas en combinaciones de los ya conocidos, con nuevos compuestos de naturaleza opiácea, nuevos esteroides antiinflamatorios (SAID), inhibidores de la recaptación de serotonina (SRNI) e inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI) etc., cuyos mecanismos de acción son conocidos.

Finalmente y de modo sorprendente, solamente 4 nuevos compuestos con acción sobre nuevas dianas para el tratamiento del dolor han sido aceptados durante estas dos últimas décadas. Estos compuestos son: 1) las subunidades $\alpha_2\delta$ del canal de calcio, a la que se une el nuevo compuesto pregabalin (Lyrica), anteriormente empleado como antiépiléptico y ahora para el tratamiento del dolor neuropático en adultos; 2) el compuesto conocido como ziconotido, toxina aislada del caracol marino, *conus geographus*, que se une al poro de entrada del canal de

calcio tipo N (Prialt); 3) los agonistas de receptores de cannabinoides sobre todo CB1 (Sativex) y finalmente los bloqueantes del canal TRPV1 (Qutenza), que contienen capsaicina y suelen aplicarse en parches para el tratamiento del dolor post-herpético.

3. DOLOR Y SISTEMA PURINÉRGICO

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

Otros subtipos de receptores fueron propuestos de modo casi inmediato, como el P2T, receptor específico para el ADP presente en plaquetas y trombocitos, actualmente conocido como P2Y₁₂. Otro receptor propuesto fue el P2Z, presente en macrófagos, linfocitos y mastocitos, cuyo agonista principal era el ATP, en ausencia de magnesio. Actualmente a este receptor se le conoce con el nombre de P2X₇ y ha sido el último de la familia de los P2X en ser clonado. El receptor P2U se propuso como específico para los nucleótidos de uridina, hoy día se encuentran englobados en la familia P2Y y hay varios subtipos (P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆). Un receptor propuesto y de especial relevancia para nuestro grupo ha sido el P2D, pues sus agonistas específicos eran los dinucleótidos descubiertos por nuestro grupo (Pintor & Miras-Portugal,

1995; 2000). Actualmente y gracias al trabajo de nuestro grupo sabemos que estos compuestos actúan sobre los receptores denominados P2X1 y P2X3, que son ionotrópicos y otros miembros de la familia P2Y.

Los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: 1) los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y 2) los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbraccio and Burnstock, 1994). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subunidades diferentes que constituyen los receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subunidades P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14) (Abbraccio et al., 2006; Burnstock, 2007). La nomenclatura empleada en este discurso tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge et al., 2009).

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

La función de los nucleótidos extracelulares en el control de las neuronas y células gliales del sistema nervioso es avalada por múltiples evidencias experimentales. Los nucleótidos extracelulares proceden de la liberación exocitótica de células excitables, y mediante mecanismos aún por definir, de células tanto excitables como no excitables. En células excitables estos compuestos están almacenados en vesículas

a las que necesitan ser transportados mediante el transportador vesicular VNUT (Gualix et al., 1996; 1999; Sawada et al., 2009). Estos compuestos pueden liberarse tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, o salir de las células cuando se rompen las membranas plasmáticas por trauma o compresión (Gutiérrez-Martin et al., 2011).

La microglía es uno de los tipos de células gliales, que tienen funciones en el sistema nervioso central, similares a los macrófagos periféricos. En estas células se ha demostrado la abundante presencia de subtipos de receptores P2X y P2Y, los cuales juegan un papel clave en la señalización dolorosa de la medula espinal en situaciones patológicas como las lesiones de los nervios periféricos, lo que se conoce actualmente como dolor neuropático.

En las astas dorsales de la medula espinal, las lesiones de los nervios periféricos producen una serie de cambios de modo progresivo en la microglía, incluyendo hipertrofia del cuerpo celular y proliferación, aspectos los dos que se consideran como índices de activación. La microglía cuando se activa produce una regulación al alza de la expresión de los receptores P2X/P2Y, siendo los mejor documentados los subtipos P2X4 y P2Y12. Estudios recientes presentan sólidas evidencias de que la manipulación farmacológica o genética, modificando su expresión, son capaces de suprimir o reducir en gran modo el dolor neuropático. El grupo del Dr. Kazuhide Inoue de Japón y el del Dr. Michael Salter de Canadá han hecho grandes contribuciones en este área (Tsuda et al., 2003; 2005).

Es indudable que un conocimiento profundo de los receptores P2 que participan en la patogénesis del dolor neuropático y en los procesos de señalización en procesos inflamatorios mediados por el sistema inmune, permitirá obtener nuevos y mejores fármacos para aliviar el sufrimiento.

3.a) Receptores Ionotrópicos de nucleótidos, familia P2X: Importancia de la Biología Molecular

Los receptores P2X son canales iónicos operados por ligando, insertados en la membrana plasmática cuyo agonista fisiológico es fundamental-

mente el nucleótido ATP. La apertura del canal permite el paso selectivo de los cationes de tamaño pequeño, Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Hasta la fecha se han identificado siete subunidades P2X diferentes, secuencialmente referidas como P2X1 al P2X7. El número de subunidades que se unen para formar el canal activo es de tres y el grupo de investigación alemán liderado por Gunter Schmalzing fue quien en un principio lo definió claramente para el receptor P2X1 y P2X3 (Nicke et al 1998). La primera subunidad identificada fue la P2X1 y se aisló del conducto deferente de rata, el descubrimiento fue publicado en la revista Nature en 1994, por el grupo de Gary Buell en el Instituto de Biología Molecular que la compañía farmacéutica de Glaxo tenía en Ginebra, Suiza (Valera et al. 1994). El título de la publicación indicaba que se trataba de una nueva clase de receptores ionotrópicos operados por ligando que respondían a ATP. En este artículo se predecía la estructura en base a la secuencia de aminoácidos como una proteína con dos dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo en el interior citosólico. Lo que significaba algo totalmente nuevo y posiblemente muy primitivo desde el punto de vista evolutivo dada su sencillez.

El segundo receptor clonado fue el P2X2, y lo realizó el grupo de David Julius en el departamento de Farmacología de la Universidad de California (Brake et al., 1994). El modelo del cual se aisló el P2X2 es el de la medula adrenal y de otros tejidos neuroendocrinos. Este receptor mostraba, por predicción de secuencia una estructura similar al P2X1, pero también con el canal epitelial de Na^+ , y los canales sensores de ácido todos ellos aparentemente muy primitivos. Al ser activado por ATP, la desensibilización del receptor era moderadamente rápida.

El gen que codifica la subunidad P2X3 se clonó inicialmente de las astas dorsales de medula espinal, DRG (Chen et al., 1995), en el Departamento de Anatomía del University College, de Londres en el Reino Unido.

Posteriormente se identificaron mediante analogía de secuencia otros receptores P2X. Conocemos hoy día la localización cromosomal de estos receptores. Tanto la subunidad P2X4 como la P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a las subunidades P2X1 y P2X5 (brazo corto

del cromosoma 13). Sin embargo el resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar, por ejemplo, las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X2. Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismos, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada.

3.b) Estructura cuaternaria de los receptores P2X

El conocimiento de la estructura cuaternaria del canal formado por los receptores P2X, la interacción de las subunidades para formar el canal activo y su apertura por el ligando, era un objetivo largo tiempo deseado, pero que se hizo esperar hasta que en el año 2009 el grupo de Eric Gouaux consiguió cristalizar el receptor P2X4, en su forma más corta (Kawate et al., 2009). El éxito de este grupo se debió a que tenían una dilatada experiencia en el estudio de estructuras de otros canales, principalmente en los canales sensores de ácido, ASIC1, que son canales activados por protones y selectivos para el ion sodio, están compuestos por tres subunidades y forman parte de la superfamilia de los canales epiteliales de sodio, canales mecanosensibles y los canales FMRF operados por péptidos. Estos canales se expresan de modo ubicuo en las células eucariotas y juegan un papel esencial en múltiples actividades biológicas, como la homeostasis del sodio, la percepción de los sabores y el dolor (Gonzales et al., 2009).

El descubrimiento de su estructura trimérica, y los vestíbulos de entrada y salida de cationes a una parte y otra de la membrana se corresponde también con una cierta analogía con la estructura cuaternaria y poro de los canales de los receptores P2X, sugiriendo mecanismos similares de funcionamiento. Curiosamente la subunidad P2X4 expresada para obtener la proteína correspondiente procedía del receptor clonado del modelo del pez cebra, *danio rerio*, por Miguel Díaz Hernández, profesor de la facultad de Veterinaria de la UCM, durante su estancia en

San Luis, USA, con el grupo del Dr. Mark Voight (Díaz-Hernández et al., 2002).

Los dos segmentos transmembrana (TM) que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, motivo por el cual las distintas subunidades se asocian como homo o heterotrímeros para formar un canal funcional (Nicke et al., 1998). El trímero posee un dominio extracelular muy extenso que sobresale aproximadamente 70 Å sobre el plano de la membrana, y una región transmembrana de 28 Å. El canal está formado por seis hélices TM, dos por cada subunidad que lo compone. Los segmentos TM1 forman múltiples interacciones con las hélices TM2 de la misma subunidad, pero también con los TM1 y TM2 de las otras subunidades. Así, las hélices TM1 presentan la mayoría de contactos con la bicapa lipídica, mientras que las TM2 cubren el poro iónico (Gonzales et al., 2009). La entrada y salida del canal están formadas principalmente por residuos hidrofóbicos e incluyen aproximadamente dos vueltas de la α -hélice del segmento transmembrana TM2. En la región extracelular, las β -láminas centrales interaccionan con las subunidades adyacentes, mientras que no se producen contactos entre ellas en la base de dicha región. Esta conformación podría permitir a las hélices transmembranares el movimiento hacia una conformación abierta ante la interacción de la región extracelular con el ligando (Kawate et al., 2009).

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

Los receptores homoméricos están compuestos por subunidades idénticas. Además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interaccionar entre sí formando hetero-oligómeros, aunque este ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X. Hasta la fecha se han descrito varios receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6 y P2X4/P2X6 (Roberts et al., 2006; Burnstock, 2007a; Abbracchio et al., 2009).

La heteromerización de la subunidad P2X7 aun no está claramente establecida ni descartada (Guo et al., 2007).

Los receptores P2X no están insertados en la membrana celular de forma aleatoria, y suelen estar agrupados o localizados en diferentes partes de la célula de modo preciso y específico en función del desarrollo. Dado que la membrana celular no es homogénea, los receptores pueden agruparse junto a las proteínas de membrana en microdominios. Un posible mecanismo para mantener las proteínas y moléculas de señalización juntas, puede ser su inclusión en balsas lipídicas (“lipid rafts”), como sucede para los receptores P2X1, P2X3 y P2X7 (Vacca et al., 2004; 2009).

3.c) Importancia del receptor P2X3 y del P2X2 en el procesamiento de la señal dolorosa

El gen que codifica la subunidad P2X2 se clonó inicialmente del tejido neuroendocrino que es la medula adrenal en 1994, como hemos señalado con anterioridad. El receptor P2X3 se clonó por primera vez de las astas dorsales de medula espinal, DRG (Chen et al., 1995), en el departamento de Anatomía del University College, de Londres en el Reino Unido, dirigido a la sazón por el Prof. Geoffrey Burnstock. Estas neuronas también expresan la subunidad P2X2 y es probable que los canales nativos sean heterotrímeros P2X2/3. La distribución de los receptores homoméricos P2X3 y de los heteroméricos P2X2/3 se encuentra restringida a las astas dorsales, ganglios sensitivos trigémino y nodoso, y en el sistema nervioso central es abundante en las terminales sinápticas colinérgicas, donde es regulado por receptores ionotrópicos presinápticos de receptores colinérgicos nicotínicos (Vuklchanova et al., 1997; Díaz-Hernández et al., 2001; Díaz-Hernández et al., 2002). Mediante estudios farmacológicos e inmunocitoquímicos se demostró su implicación en la transmisión del dolor persistente en la inflamación crónica y en el dolor neuropático (Gever et al., 2006).

La demostración definitiva de la gran relevancia del receptor P2X3, tanto homomérico como formando parte de los heterómeros P2X2/P2X3

en la transmisión nociceptiva y la transducción mecanosensorial en las vísceras, quedó patente cuando se dispuso de animales genéticamente modificados en los cuales se bloquea la presencia de receptor funcional P2X3. Dos grupos independientes publicaron en Nature en el año 2000 sendos artículos definiendo las características del ratón donde se había conseguido deleccionar el gen del receptor P2X3 (Cockayne et al., 2000; Souslova et al., 2000). Haremos especial mención al grupo de Debra Cockayne, por la solidez de su trabajo. Este grupo pertenecía a la Unidad de Neurobiología del Instituto Roche de Palo Alto en California y establece claramente que el ratón deficiente en P3X3 presenta escasa sensibilidad a los modelos clásicos de comportamiento frente a estímulos dolorosos, como es la inyección de formalina en las extremidades. Este resultado se explicaba por la escasa corriente en respuesta al ATP de las neuronas del ganglio nodoso en los animales KO para el receptor P2X3. Otro aspecto relevante descrito en este modelo animal fue que muestran una acusada hiporeflexia del vaciado de la vejiga urinaria, lo que lleva aparejado un incremento en la retención de orina y en el tamaño de la vejiga. Los estudios inmunohistoquímicos mostraron que el receptor P2X2 es muy abundante en las fibras nerviosas que inervan la vejiga urinaria en el animal silvestre y también que la falta de P2X3 no altera la densidad de las fibras y su capacidad de inervación, pero si la respuesta específica del P2X3. Todo ello les llevo a proponer que el receptor P2X3 es esencial para transmitir la señal dolorosa por las vías aferentes y para controlar los reflejos de la vejiga urinaria en su función fisiológica. Los antagonistas P2X3 se postulaban como dianas terapéuticas de gran potencialidad tanto en la señal dolorosa como en los desordenes que implican una vejiga hiperactiva.

Con posterioridad este modelo de ratón P2X3 $-/-$, permitió al mismo grupo de Debra Cockayne descubrir que el urotelio que tapiza la vejiga urinaria libera grandes cantidades de ATP, que es el agonista fisiológico del receptor, siendo la presión ejercida por la orina sobre el tejido lo que provoca su salida, sin olvidar que en las infecciones del tracto urinario hay una mayor salida del nucleótido en respuesta a la irritación (Vlaskovska et al., 2001).

La peristalsis intestinal en el ratón KO del P2X3, también está alterada con respecto al ratón silvestre, trabajo que fue una secuela del mis-

mo grupo, entre otros muchos. En experimentos *in vivo* midiendo el tránsito gastrointestinal demostraron que el receptor P2X3 contribuye a detectar la distensión, y que al incrementarse la presión intraluminal inicia las contracciones reflejas, que se definen como peristaltismo intestinal. Aspectos fisiológicos que están reducidos en el ratón KO y aumentados en los procesos irritativos donde el ATP es abundante y que han tratado de relacionarse con las respuestas exacerbadas en algunas patologías, como la del colon irritable (Bian et al., 2003).

La abundancia de receptores heteroméricos P2X2/P2X3, planteó la necesidad de obtener tanto el KO de la subunidad P2X2, como los doble knockout. Ambos fueron empleados por el grupo de Debra Cockayne demostrando que son esenciales en la señalización de ATP en órganos y terminales nerviosas aferentes (Cockayne et al., 2005; Ford and Cockayne, 2011).

La importancia de estos receptores como dianas terapéuticas ha incentivado a las compañías farmacéuticas para obtener una larga serie de compuestos, algunos de ellos con actividad *in vivo* y desarrollados sobre todo para paliar el dolor en situaciones especialmente críticas y para las cuales los tratamientos actuales son ineficaces como es el caso del dolor asociado a las metástasis óseas. Es de destacar que las aferentes primarias nociceptivas, incluidas las que inervan el hueso expresan los receptores P2X3 homoméricos, o los heteroméricos P2X2/P2X3. En un modelo experimental de cáncer bien definido, como es el de carcinoma de hueso inducido en la rata, un potente antagonista procedente de los laboratorios Abbott, el AF-353, que puede ser administrado por vía oral, produjo una notable reducción de la señal dolorosa, sin alterar el transcurso de la enfermedad, ya que la destrucción del hueso inducida por las células del carcinoma MRMT-1 no modificaron su agresividad ni su invasividad. Los efectos sobre el dolor eran evidentes ya que el efecto analgésico se traducía en una reducción de señalización de las fibras aferentes (Kaan et al., 2010). Otros muchos modelos y situaciones dolorosas han sido analizados y estos receptores siguen postulándose como dianas válidas para el tratamiento del dolor, siendo el grupo de Michael Jarvis en la compañía farmacéutica Abbott uno de los más activos y exitosos. Un aspecto relevante es que todos los inhibidores sintetizados que inhiben el P2X3

homomérico, también inhiben el heterotrímero P2X2/P2X3, aunque algunos de ellos con una eficacia ligeramente menor, curiosamente apenas tienen actividad sobre el homomérico P2X2 (Gum et al., 2012).

3.d) Importancia del receptor P2X4 en la génesis y procesamiento de la señal dolorosa: papel de la microglía

La importancia del receptor P2X4 en la señalización dolorosa es debida a su abundante presencia en la microglía. Este hecho me obliga a rendir homenaje a uno de nuestros grandes histólogos, Don Pío del Río-Hortega, quien describe la microglía en 1920. La denomina el tercer elemento, siendo diferente de las neuronas y de los astrocitos. La función de la microglía fue durante muchos años objeto de debate, la visión meramente estática o de células soporte ha sido sustituida por una visión dinámica implicándola en las patologías del sistema nervioso originadas como consecuencia de lesiones. Esta situación tiene especial relevancia en la patogénesis del dolor neuropático, situación de dolor crónico que se presenta después de lesión de los nervios periféricos causada por infección o lesión traumática. Una de las moléculas señalizadoras que más influye en la activación de la microglía es el ATP y estas células expresan una amplia variedad de receptores P2, entre ellos los metabotrópicos P2Y6 y P2Y12 y los ionotrópicos P2X4 y P2X7. De todos estos receptores es el P2X4 el que se incrementa de modo absoluto en la microglía reactiva, por esa razón dedicaremos este apartado a conocer los mecanismos del P2X4 en la génesis de la señalización dolorosa mediados por microglía reactiva. Muchos de los trabajos implicando al receptor P2X4 en la función de la microglía reactiva proceden de dos grupos excelentes, de modo independiente o en colaboración, el del Dr. Michael Salter en Canadá y del Grupo del Dr. Kazuhide Inoue en Japón (Trang et al., 2001; Tsuda et al., 2003, 2013).

La primera evidencia de que los receptores P2X4 están implicados en el dolor neuropático fue publicado por el grupo de Inoue (Tsuda et al., 2003). Este grupo demostró que la inyección intratecal de un derivado del ATP, el (2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl) adenosina 5'-trifosfato, conocido como TNP-ATP, un antagonista del receptor P2X1 y del

P2X4 revertía la alodinia táctil en las ratas con los nervios lesionados. Por el contrario, el piridoxalfosfato-6-azofenyl-2',4'-disulfónico ácido, conocido como, PPADs, que es un antagonista de los receptores P2X1, P2X3, P2X5 y P2X7, pero no del P2X4, al ser inyectado intratecalmente, no revertía la sensación dolorosa de la alodinia táctil (Inoue et al., 2004). Una revisión muy ilustrativa fue publicada en Trends in Neuroscience participando los dos grupos más activos en microglía hasta aquel momento (Tsuda et al., 2005).

Una confirmación de que el receptor P2X4 era el implicado en la alodinia y el dolor neuropático se obtuvo bloqueando con nucleótidos antisentido el receptor P2X4 y en el modelo de ratón genéticamente modificado en el cual se había deleccionado el gen P2X4. Estos animales P2X4^{-/-} muestran muy atenuado el dolor inducido tras la lesión nerviosa (Ulmann et al., 2008; 2010). El desarrollo de la alodinia táctil se correlaciona con el progresivo incremento de la expresión del receptor P2X4 en la medula espinal, el cual normalmente está presente en muy bajo nivel en el sistema nervioso central de los animales control. Analizadas las células que expresan estos receptores se constata que están en la microglía y que no existe incremento paralelo en las neuronas.

La señalización del ATP incrementando el calcio citosólico, induce la activación de una serie de cascadas de señalización, entre ellas las de la proteína P-38-MAPK, siendo responsables de liberar el BDNF en el sistema nervioso central, en casos de inflamación. El mismo grupo del Profesor Inoue demostró que la inyección en las astas dorsales de las ratas lesionadas de un inhibidor de la P38-MAPK suprimía la alodinia (Inoue et al., 2004; Inoue, 2006 a, b). En los macrófagos periféricos, que son células similares a la microglía del Sistema Nervioso Central existe un receptor P2X4 funcional y su activación lleva a la producción y liberación de la Prostaglandina E2, que es el principal sustrato de la inflamación, siendo capaz de sensibilizar los nociceptores periféricos (Ulmann et al., 2010).

El receptor P2X4 está pues en un lugar privilegiado para convertirse en diana preferente para el tratamiento del dolor neuropático al ser capaz de frenar la etiopatología del dolor inflamatorio. Dos aspectos esenciales

cuando se trata del tratamiento del dolor. El conocimiento de las cascadas de señalización del P2X4 puede aportar nuevas vías para remediar los efectos inflamatorios de la microglía sobre el sistema nervioso.

Otros modelos con dolor crónico asociado han puesto de manifiesto que el P2X4 es también una pieza clave en el desarrollo del dolor neuropático en la neuritis experimental autoinmune en la que se observa una inflamación aguda con desmielinización de las raíces de los nervios sensitivos que es el subtipo más frecuente del síndrome de Guillain-Barre, que es un trastorno autoinmunitario y se desconoce el agente que lo desencadena exactamente (Zang et al., 2008).

El síndrome de fatiga crónica se acompaña a menudo con un extendido dolor muscular que se asemeja al síndrome de fibromialgia. Estos síntomas empeoran con el ejercicio y se ha tratado de conocer mediante un amplio estudio de expresión de genes cuales eran los que mostraban mayores diferencias entre individuos sanos y los que sufrían de fibromialgia o fatiga crónica. Entre los genes que mostraban mayor incremento después de un moderado ejercicio están algunos canales sensores de ácido ASIC3 y los receptores P2X4 y P2X5 (Light et al., 2009; 2012).

La validación de los receptores P2X4 para el tratamiento en el dolor crónico se ha visto muy limitada por la ausencia de un agonista selectivo. El mejor agonista es el nucleotidotrifosfato ATP. El CTP es activo, pero tiene escasa afinidad por el receptor, la ivermectina es un activador alostérico y ha sido uno de los utensilios farmacológicos para caracterizar el receptor. El antagonista TNP-ATP tiene una IC₅₀ de 15 μ M, pero es mucho más activo bloqueando los receptores homoméricos P2X1 y P2X3, o los heteroméricos P2X2/P2X3, estos últimos muy abundantes en la lámina superficial de las astas dorsales de la medula espinal. Hasta el momento y a pesar del esfuerzo de la industria farmacéutica son muy pocos los compuestos inhibidores del P2X4 descritos en la literatura, los cuales han sido recogidos en una reciente publicación del grupo de Michael Jarvis de la compañía farmacéutica Abbott (Gum et al., 2012).

La elucidación de la estructura cristalina del receptor P2X4 por el grupo de Eric Gouaux en 2009, ofrece ahora nuevas perspectivas para

el diseño racional de agonistas y sobre todo antagonistas. No podemos olvidar que esta estructura ha demostrado que el sitio de unión del agonista está localizado en una zona totalmente diferente de donde se pensaba, esto es se une a las zonas de interconexión entre las subunidades y próxima a la membrana plasmática (Kawate et al., 2009; Hattori and Gouaux, 2012).

A falta de compuestos específicamente sintetizados para actuar sobre el receptor P2X4, un gran número de fármacos utilizados para otras patologías, sobre todo del sistema nervioso se han ensayado sobre este receptor. Por casualidad un grupo de compuestos utilizados como antidepresivos, entre ellos la paroxetina que inhibe el transporte de serotonina, resultó ser un eficaz inhibidor el receptor P2X4, produciendo analgesia y revirtiendo la alodinia táctil posterior a la lesión de nervios periféricos en ratas (Nagata et al., 2009). Es de destacar que los antidepresivos se están utilizando ampliamente en el tratamiento del dolor, y no existía una base científica para este uso. Con estos resultados se respalda su utilización y es un punto de partida en una diana tan importante y tan esquiva como el P2X4.

4. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN DOLOROSA

Para comprender la importancia del receptor P2X7 como diana en el tratamiento de múltiples patologías, incluidas las enfermedades que evolucionan a estados degenerativos nerviosos, o de articulaciones periféricas ligadas al sistema inmune, como la artritis reumatoide, es necesario conocer la complejidad de este receptor y su sistema de señalización. Recientemente el grupo del profesor Michael Salter de la Universidad de Toronto ha introducido el elemento de los polimorfismos del receptor P2X7 en la sensibilidad al dolor. El modelo han sido las distintas cepas de ratones de laboratorio, pero abren la puerta a la enorme variabilidad y polimorfismos que existen en humanos. Es posible que en humanos las variantes de este receptor sean importantes para definir el umbral de la sensación dolorosa y que esta pueda estar genéticamente definida (Sorge et al., 2012). En otras publicaciones de nuestro grupo, no relacionadas con la señal dolorosa, hemos puesto

de manifiesto la importancia de este receptor P2X7, es el caso de la epilepsia debida a lesiones en el lóbulo temporal, donde la farmacología dirigida a estos receptores puede paliar las crisis convulsivas del *status epilepticus*, o servir como alternativa en el tratamiento de las epilepsias refractarias a la farmacología clásica (Engel et al., 2012; Henshall et al., 2013).

4.a) Características del receptor P2X7

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

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

De especial relevancia ha sido el trabajo de Annette Nicke realizado en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Max Planck para

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

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

Hasta la fecha se han descrito 10 variantes de procesamiento (splicing) (P2X7b-P2X7k), nueve de ellas en humano (P2X7b-P2X7j) y una en rata y ratón (P2X7k), aunque sólo 4 de estas variantes se han detectado a nivel proteico (P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k) (Cheewatrakoolpong et al., 2005; Feng et al., 2006; Nicke et al., 2009), y sólo dos de ellas parecen ser funcionales (P2X7b y P2X7k) (Cheewatrakoolpong et al., 2005; Nicke et al., 2009). La variante P2X7a es la proteína completa.

El grupo de Gorodeski en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Ciencias de la Salud en Bethesda, Maryland en USA, realizó importantes estudios sobre la forma truncada del receptor P2X7j, de 258 aminoácidos, a la cual le falta un tercio del loop extracelular, el segmento transmembrana 2 y toda la zona carboxilo terminal. La importancia de esta proteína es que se expresa muy poco en las células normales,

pero es muy abundante en cierto tipo de tumores, como es el de cuello uterino y otros tumores de células epiteliales. Su mayor expresión se ha relacionado con un peor pronóstico de este tipo de tumores.

Además de las variantes de procesamiento, este receptor presenta un gran número de variantes de un único nucleótido, SNP. El amplio estudio de sus polimorfismos se debe a la presencia del receptor P2X7 en macrófagos y linfocitos y su relación con el pronóstico de diversos tipos de leucemias, sobre todo con la leucemia familiar crónica (Wiley et al., 2002). La mayoría de estos SNPs confieren la pérdida de función de algunos eventos activados por el receptor P2X7 aunque algunos inducen ganancia de función (Cabrini et al., 2005). Recientemente el grupo de Michael Salter en la Universidad de Toronto ha relacionado cambios de un único nucleótido que resultan en un aminoácido diferente en la zona del carboxilo terminal, cambiando una prolina por otro aminoácido, en la pérdida de posibilidades de este receptor para conectar con proteínas de membrana que llevan al poro citolítico (Sorge et al., 2012).

4.b) Características farmacológicas del receptor P2X7

La estimulación del receptor con agonistas durante un breve periodo de tiempo (<10 segundos) conduce a una apertura rápida y reversible del canal, que permite el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Como se ha mencionado anteriormente, los receptores P2X7 homoméricos son activados por elevadas concentraciones de ATP (EC_{50} 400 μM) y por BzATP, siendo este último significativamente más potente (20 μM) que el ATP.

El BzATP fue usado durante mucho tiempo como un agonista específico del receptor P2X7. Sin embargo el BzATP no es un agonista selectivo del receptor P2X7, puesto que también activa los receptores P2X1 y P2X3 y receptores de la familia metabotrópica P2Y. En nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto que también es un agonista del receptor metabotrópico P2Y13 en astrocitos de cerebelo de rata y del P2Y2 en la línea tumoral de neuronas simpáticas N2a (Carrasquero et al., 2009; Gómez-Villafuertes et al., 2009; León-Otegui et al., 2011).

Los antagonistas más empleados con los receptores P2X y P2Y, suramina y PPADS, no son selectivos para el receptor P2X7 y lo bloquean con baja afinidad y de forma no competitiva. El colorante alimentario Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo, sobre todo en rata ($IC_{50} \sim 10-15nM$) y en ratón ($IC_{50} 100 nM$), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ($IC_{50} \geq 10\mu M$) (Young et al., 2007). El BBG se une al receptor en un sitio de unión diferente al del ATP y el equilibrio de disociación se establece lentamente (Michel et al., 2007).

Otros inhibidores, como el KN-62 (conocido como inhibidor de la calcio/calmodulina quinasa tipo II, CaMKII), ejercen su efecto en función de la especie, bloqueando el receptor P2X7 humano de forma no competitiva, pero no el de rata (Gargett & Wiley, 1997; Humphreys et al., 1998). En 2006 los laboratorios Abbott generaron dos nuevos antagonistas selectivos para el receptor P2X7, el A-438079, tetrazol que bloquea de forma competitiva y reversible los receptores P2X7, y el A-740003, cianoguanidina que actúa de forma competitiva sobre los receptores, ambos con acción tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore et al., 2006; Nelson et al., 2006). Recientemente se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers et al., 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una IC_{50} en el rango nanomolar (Chen et al., 2010).

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

4.c) Señalización del receptor P2X7

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de los receptores P2X7 induce la apertura rápida y reversible del canal, lo que permite el paso de iones Ca^{2+} , Na^+ y K^+ produciendo la despolarización de la

membrana. La consecuente entrada de calcio a la célula conecta con múltiples vías de señalización donde este ion es el desencadenante necesario, como son las relacionadas con la calcio calmodulina quinasa, las proteína quinasas de tipo C sensibles a calcio, la fosfolipasa D y la cascadas derivadas, entre ellas la GSK-3 (Díaz-Hernández et al., 2008; Ortega et al., 2009; 2010; 2011) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs). Es necesario tener en cuenta que cada tipo de célula tiene sus cascadas de señalización y por lo tanto el tipo de respuestas asociados al P2X7 dependen del modelo de estudio.

En los procesos neurales la entrada de calcio al citosol es importante para la liberación de neurotransmisores mediante el proceso excitotóxico. Al mismo tiempo es necesaria una reorganización del citoesqueleto para permitir la aproximación de nuevas vesículas secretoras y este proceso necesita la cascada de señalización de la calcio calmodulina, que activa la calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, lo que permite la separación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores (León et al., 2006; 2008).

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

Por otro lado, la activación del receptor P2X7 también es capaz de inducir la activación de otras proteínas en un proceso independiente de la entrada de calcio, como por ejemplo la activación de PKD en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero et al., 2010). Otro tipo de señalización es hacia las fosfatasa duales que ha sido puesto de manifiesto en la DUSP2-de localización nuclear y en la DUSP 6 de localización citosólica, mediada por P2X7. Este trabajo ha sido recientemente aceptado para su publicación y permite comprender la señalización y mecanismos que vuelven al estado inicial para que la célula sea capaz de responder a nuevos estímulos de membrana (Morente et al., 2014).

4.d) Receptor P2X7: enfermedades neurodegenerativas y neuroreparación

Mediante técnicas de hibridación *in situ* y análisis por RT-PCR se ha podido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo e hipotálamo y el hipocampo (Yu et al., 2008). En un estudio de gran relevancia el Prof. Zimmerman demostró que en los progenitores neurales de la zona subventricular, los receptores P2 y las ectoenzimas que los destruyen actuaban de modo secuencial en el tiempo y según el área de migración, aunque no estaba entre ellos el receptor P2X7 (Zimmermann, 2011). Trabajos posteriores del grupo del Profesor Peter Illes los han identificado como esenciales para la diferenciación en la zona subventricular (Messemer et al., 2013).

Respecto a la presencia de receptores funcionales, nuestro grupo fue pionero en el estudio de la caracterización y función del P2X7 en el sistema nervioso. La idea de que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas pues su activación producía un poro citolítico que producía la muerte neuronal fue sostenida durante más de 10 años por uno de los grupos ingleses más potentes. Contra esta idea fue necesario que nuestro grupo de la Facultad de Veterinaria de Madrid diseñara experimentos en los cuales se demostrara sin ningún género de dudas que las respuestas en los modelos neurales pertenecían a este receptor. Actualmente hemos conseguido que la comunidad científica internacional acepte plenamente nuestros descubrimientos. La ayuda inestimable del Profesor Rodríguez Artalejo y su grupo de la facultad de Veterinaria de Madrid, permitió aplicar técnicas de electrofisiología para definir las corrientes y separar el proceso de entrada de iones, de la formación del poro citolítico, el cual solo ocurre en células en las que las panexinas u otro tipo de elementos de membrana están presentes, coincidiendo con los resultados ya enunciados del grupo del Profesor Salter en Canadá (Salas et al., 2013, Sorge et al., 2012).

La abundante presencia del receptor P2X7 en neuronas es la antesala de su gran relevancia en procesos fisiopatológicos, estando algunos ya confirmados. El primer trabajo demostrando claramente que el P2X7 estaba presente y era funcional lo realizamos en neuronas granulares

de cerebelo, mediante técnicas de microfluorimetría y video microscopía y también en terminales sinápticas obtenidas de diversas áreas del cerebro de rata, analizando cada terminal sináptica de modo aislado (Miras-Portugal et al., 2003).

Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas, dado que más del 50% presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad, y es posible, además, medir respuestas presinápticas en ellas al estimularlas con agonistas específicos del receptor P2X7 (Miras-Portugal et al., 2003; Hervás et al., 2005; Sánchez-Nogueiro et al., 2009; Marín-García et al., 2008). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de estos receptores, la modulación de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, el glutamato o el GABA de las terminales presinápticas del SNC (Gómez-Villafuertes et al., 2001; León et al., 2008; Sperlagh et al., 2007; Gualix et al., 2003; Díaz-Hernández et al., 2002).

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

Uno de los modelos más empleados para interpretar las primeras etapas de la formación del cono y desarrollo axónico es el del cultivo de neuronas embrionarias de hipocampo. En este modelo se realizaron importantes descubrimientos relacionados con la reorganización del citoesqueleto, y las cascadas intracelulares que regían estos cambios de plasticidad y morfología. La técnica fue descrita con detalle en un artículo publicado en 1988 en la revista Nature por Banker y Goslin de la Facultad de Medicina de la Universidad de Albany en Nueva York. Esta técnica ha sido de gran utilidad a nuestro grupo. Los animales de partida son embriones de ratón de E17, de los cuales se disecciona el hipocampo y se separan las células con tripsina. Una vez superados los 17 días de desarrollo in útero de los ratones, las neuronas de hipocampo son demasiado maduras para modificarse en cultivo (Garrido et al., 2007). La formación de los circuitos neurales depende inicialmente de establecer dominios bien segregados a modo de compartimentos

axónico y dendrítico y la primera gran etapa es la formación de un cono de crecimiento que lleve a la formación del axón y permita su elongación. Esto supone importantes cambios morfológicos y la reorganización coordinada de los citoesqueletos de actina y tubulina.

El ATP es capaz de modular negativamente el crecimiento y arborización del axón. La identificación de receptores P2X7 funcionales que mediaban la entrada de calcio hizo que nos planteáramos: ¿Cuál era la función fisiológica del P2X7 en el cono de crecimiento? El resultado fue que tratando estas neuronas con antagonistas farmacológicos del receptor, como el Azul Brillante G, BBG; o mediante supresión con RNA de interferencia del P2X7, se produce un incremento de la longitud axonal y de las ramificaciones. Una vez estudiadas las rutas de señalización intracelulares que median esta respuesta fisiológica, se puso de manifiesto la importancia de la actividad de la Ca^{2+} -calmodulina dependiente proteína quinasa II (CaMKII), la quinasa de adherencia focal (FAK), la fosfatidil inositol quinasa 3 (PI3K), etc. (Díaz-Hernández et al., 2008; Gómez-Villafuertes et al., 2009; del Puerto et al., 2012; Gutiérrez-Martín et al., 2011). Recientemente hemos completado la panorámica molecular en los eventos de crecimiento y arborización axonal y la modulación del propio receptor por dos receptores metabotrópicos P2Y que modulan positiva y negativamente el crecimiento, siendo respectivamente el P2Y1 y el P2Y13 (del Puerto et al., 2012).

La presencia del receptor P2X7 en las terminales sinápticas del cerebro maduro y posteriormente la función organizadora del cono de crecimiento axonal en las neuronas inmaduras, hizo que nos planteáramos la pregunta siguiente: ¿Tiene alguna función el receptor P2X7 en las terminales sinápticas en el proceso de neurodegeneración?

En nuestros estudios en colaboración con el Dr. José Javier Lucas, del Centro de Investigación Severo Ochoa, hemos utilizado dos modelos murinos para tratar de comprender el papel de los receptores presinápticos P2X7 en la enfermedad de Huntington. Los modelos en cuestión han sido el de los ratones R6/1, línea que fue desarrollada por Bates y colaboradores (Bates et al., 1997). Este modelo expresa el exón 1 del gen de la Huntingtina mutada con 115 repeticiones del triplete CAG. Hasta los dos meses de edad estos ratones no muestran

ningún fenotipo neurológico y tampoco pérdida de neuronas estriatales. El segundo modelo ha sido el de los ratones condicionales Tet/HD94, que expresan el gen mutado con 94 repeticiones del triplete CAG. La regulación del sistema se realiza mediante un trans activador regulado por tetraciclina. Mientras los animales reciben en el agua tetraciclina la huntingtina mutada no se expresa. La descripción completa del modelo y sus ventajas está recogida en la publicación del grupo en la prestigiosa revista Cell (Yamamoto et al., 2000).

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

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

En otra enfermedad neurodegenerativa devastadora como es la enfermedad de Alzheimer familiar, hemos podido comprobar como la modulación de la actividad de los receptores P2X7 producía una reducción del tamaño y número de placas de amiloide. Este hallazgo efectuado en el modelo de ratón genéticamente modificado, portador de las mutaciones humanas, indiana y sueca para la proteína APP, nos ha permitido constatar la importancia del receptor P2X7 en la actividad de las proteasas que procesan la proteína precursora de amiloide APP. Este

receptor a través de la señalización mediada por la cascada que lleva a la fosforilación del enzima Glucógeno sintasa quinasa-3, GSK-3, es capaz de reducir la actividad de la α -secretasa, que es no amiloidogénica. Una inhibición de este receptor redundaría en una mayor actividad del enzima y por lo tanto beneficiosa para evitar la producción y acúmulo del péptido amiloide A β 42, responsable de la formación de las placas extracelulares de amiloide. El artículo recientemente publicado demuestra claramente que el acúmulo de las placas de amiloide es reversible (Díaz-Hernández et al., 2012).

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

El receptor P2X7 esconde todavía muchas sorpresas, uno de los últimos hallazgos de nuestro grupo se refiere al *status epilepticus*, emergencia neurológica que puede dañar el cerebro de modo irreversible. El *status epilepticus* resulta de un fallo en los mecanismos normales para finalizar una crisis epiléptica, en particular la inhibición mediada por el ácido γ -amino butírico y las benzodiazepinas anticonvulsivantes son a menudo escasamente eficaces. El ATP que actúa sobre receptores ionotrópicos, los P2X y cuyos receptores están presentes en las sinapsis del hipocampo tiene una excepcional función. Esto se demuestra en modelos de *status epilepticus* inducido en animales mediante inyección de ácido kaínico en la amígdala, cuya conexión vía al hipocampo incrementa selectivamente los niveles hipocámpales del receptor P2X7, y muy escasamente los otros receptores de la familia. La inducción de *status epilepticus* en un ratón genéticamente modificado que expresa el P2X7 asociado con la proteína verde fluorescente permite identificar exactamente que el incremento se produce en la neuronas granulares del giro dentado, con formación masiva de nuevas ramificaciones y conexiones (Engel et al., 2012; Henshall et al., 2013).

El receptor P2X7 es aparentemente una diana farmacológica de primer nivel en diversas patologías neurodegenerativas y con capacidad para actuar como diana de reparación cuando se lo bloquea. La cuestión es

si su presencia en microglía y en las zonas de crecimiento y ramificación de las terminales axónicas lo implica en la señalización dolorosa y mediante que mecanismos.

4.e) P2X7 génesis de señales nociceptivas y desarrollo farmacológico

Trabajos pioneros de nuestro grupo demostraron la presencia del receptor P2X7 funcional en las células neurales en el año 2003, hasta entonces su presencia era aceptada solamente en las células del sistema inmune, siendo los macrófagos el modelo para estudiar su funcionalidad y propiedades (Miras-Portugal et al., 2003). Pero la importancia del P2X7 y el desarrollo de su farmacología se deben en gran medida a su abundante presencia en macrófagos y otras células del sistema inmune. Otro aspecto relevante es que el receptor P2X7 se encuentra también en microglía, pero su presencia en la microglía reactiva es mucho menos espectacular que la del receptor P2X4. Los fracasos en conseguir compuestos activos sobre el receptor P2X4, hicieron que la industria se volcara con el receptor P2X7, del cual se han sintetizado múltiples compuestos que son activos por vía oral y muy activos sobre modelos animales *in vivo*.

Los animales KO del receptor P2X7, resultaron ser fallidos en el sistema nervioso, por existir un segundo exón de inicio. No obstante en el sistema inmune el receptor que se expresa lo hace exclusivamente a partir del primer exón, que está bloqueado, por lo cual se comportan como auténticos KO, los ratones P2X7(-/-) muestran una menor liberación y producción de citoquinas (Solle et al., 2001).

En un modelo de artritis experimental empleando anticuerpos monoclonales contra el colágeno, los ratones P2X7(-/-) mostraban una menor incidencia y severidad de la artritis cuando se comparaban con el ratón control silvestre. De modo inesperado el KO también mostró menor sensación nociceptiva en los modelos de dolor inflamatorio y neuropático, lo cual está de acuerdo con ratones que no liberan ambas isoformas de las interleuquinas IL-1 α e IL1- β . Disponemos hoy día de una amplia gama de antagonistas selectivos, muchos de ellos de muy

reciente incorporación a la farmacología y además que pueden ser administrados oralmente o por vía sistémica. Una limitación es que la mayoría han sido diseñados y son activos en ratón, pero su afinidad en humanos es muy diferente. Entre los ejemplos más conocidos están el KN-62 que es más activo en humanos y el Azul Brillante G (Brilliant Blue G, BBG) que es más activo en ratas. Estos compuestos y otros sintetizados al inicio, han sido descartados, por no ser del todo específicos, pero actualmente se dispone de un amplio arsenal con gran valor terapéutico, lo que indica que el receptor P2X7 es una diana farmacológica estratégica. Por ejemplo el compuesto denominado AACBA es capaz de atenuar la artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno, y algunos derivados de la serie de la adamantina han sido capaces de reducir los síntomas de la artritis reumatoide. Un reciente número de la revista *Purinergic Signalling*, está íntegramente dedicado al desarrollo comercial de compuestos purinérgicos con actividades farmacológicas potentes y otros de diagnóstico y evaluación, así como marcadores de diversas patologías (Burnstock, 2012).

Otros antagonistas que han resultado válidos en modelos experimentales de nocicepción crónica, son los A-740003 y el A-438079, que son antagonistas competitivos del receptor P2X7 y reducen la hiperalgesia inflamatoria. Los antagonistas selectivos del receptor P2X7 también reducen la nocicepción en algunos, pero no en todos los modelos experimentales de dolor neuropático. Lo que sí es prometedor es que en dos modelos murinos de cáncer, el P2X7 media en la nocicepción, sin que se vean implicadas las células microgliales. De hecho el papel de los receptores P2X7 en el dolor neuropático tropieza con el hecho experimental de que la inyección intratecal de sus antagonistas no parece tener efecto alguno sobre el dolor.

El receptor P2X7 se consideraba como homotrímico, pero trabajos recientes apuntan a que puedan formarse heterotrímeros con el receptor P2X4, lo que explicaría alguna de sus propiedades (Casas-Pruneda et al., 2009; Guo et al., 2007).

La coimmunoprecipitación de ambos receptores podría confirmar estos heterotrímeros, pero no se descarta otro tipo de asociación con localizaciones muy próximas. Otro dato es que en la microglía inactiva en

reposo, el P2X4 está localizado en organelas intracelulares, mientras que el P2X7 está más en la membrana plasmática, distribución que cambia significativamente cuando la microglía se reactiva y ambos receptores se localizan muy próximos en la membrana.

El receptor P2X7 es una de las más prometedoras dianas farmacológicas que han surgido en estos últimos años y sus funciones en dolor, sistema inmune y formación y alteraciones en el sistema nervioso tienen que ser cuidadosamente estudiadas para poder beneficiarnos de toda su potencialidad (Gum et al., 2012).

5. RECEPTORES P2Y EN LA GÉNESIS Y TRATAMIENTO DEL DOLOR

La presencia de receptores P2Y es ubicua en todas las células de mamíferos, aunque suelen tener patrones de expresión diferente dependiendo del tipo de célula (Hervás et al., 2005; Díaz-Hernández et al., 2008).

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A. En general responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas. Poseen 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, el extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular.

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

El primer receptor identificado mediante técnicas de biología molecular fue el P2Y1 y lo clonó de cerebro de pollo en su fase embrionaria, el grupo del profesor Eric Barnard de la Universidad de Cambridge, Reino Unido (Webb et al., 1993). La expresión del RNA complementario en ovocitos de *Xenopus*, mostró claramente respuestas al nucleótido ATP. Como ironía del destino, señalar que el ATP es un agonista parcial y

que el verdadero agonista del receptor P2Y1 es el ADP, que induce la respuesta máxima.

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

Cada uno de los receptores clonados, además del P2Y1 y del P2Y2, tiene su propia historia, por ello me centraré en posteriores epígrafes en los que por el momento son más relevantes para la señalización dolorosa y su tratamiento.

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 están acoplados principalmente a la fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína Gq/11 insensible a toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC/IP3, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares, y activan la proteína quinasa C (PKC) en las células que los expresan, activando así numerosas cascadas de señalización secundarias, como la cascada de las MAP quinasas en astrocitos. Una cascada de señalización totalmente nueva y relacionada con plasticidad y posible clave de la astrogliosis reactiva es la ruta descubierta en nuestro laboratorio por las Dras. Esmerilda García Delicado y Luz María Gutiérrez Carrasquero. La señalización es la de activación de la Proteína Quinasa D, PKD, y su efecto en la fusión de membranas subcelulares implicadas en la dinámica del interior celular (Carrasquero et al., 2010).

Los receptores P2Y clonados recientemente, P2Y12, P2Y13 y P2Y14, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de

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

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} o K^+ , los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner & Boehm, 2004; Abbracchio et al., 2006). Estas vías de señalización en el SNC de mamíferos son importantes para la regulación de la plasticidad sináptica, la modulación de la liberación de neurotransmisores y los procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

Los niveles de los receptores P2Y pueden variar según el estado fisiopatológico del modelo de estudio, generalmente en estas situaciones se modifican muchos parámetros y familias de receptores, y por ello haremos un apartado dedicado a estos modelos en los que intentamos reproducir una anomalía o enfermedad específica (Marín-García et al., 2009).

Debido a la importancia de la microglía en la génesis del dolor neuropático, haremos especial mención a los receptores P2Y que juegan un papel relevante en estas células, sin olvidar los receptores expresados en sistemas vasculares y tejidos neurales donde la sensación dolorosa se debe a otro tipo de señalización.

5.a) Importancia del receptor P2Y6 en la microglía y la señalización dolorosa

Las células de la microglía además de expresar los receptores P2X4 y P2X7, expresan una amplia variedad de receptores P2Y metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Uno de estos receptores es el P2Y6 que se encontró primero en los modelos de microglía en cultivo (Koizumi et al., 2007). En los modelos de dolor neuropático, con lesión del nervio periférico el RNA mensajero del P2Y6 esta notablemente incrementado en la medula espinal y su evolución en el tiempo se corresponde con la aparición de síntomas de la alodinia táctil (Inoue and Tsuda, 2011).

La función del P2Y6 en la microglía sigue siendo elusiva, aunque datos recientes confirman que este receptor desencadena las cascadas que llevan a la microglía a iniciar los procesos de fagocitosis. No podemos olvidar que el agonista fisiológico de este receptor es el UDP y que la adición de este nucleótido difosfato facilita la fagocitosis microglial (Koizumi et al., 2007). A nivel del sistema nervioso central la administración de un toxico nervioso que actúa sobre un subtipo específico de receptores de Glutamato, el ácido kaínico (KA), también origina un incremento en la expresión de los receptores de microglía del hipocampo. Al parecer los tóxicos nerviosos que causan con muerte neural, como es el caso del kainato, inducen un incremento de UTP fuera de la célula que es metabolizado por las ecto-nucleotidasas de la membrana plasmática a UDP de modo muy rápido. Este UDP proveniente de las neuronas lesionadas es el que induce la fagocitosis microglial y se expresa en mayor medida el P2Y6. El alcance de estos descubrimientos y si el P2Y6 podrá ser una diana para el tratamiento del dolor, es algo todavía por definir y requerirá de mucho esfuerzo para ser comprendido en su totalidad (Inoue and Tsuda, 2011).

5.b) Receptor P2Y12, dolor neuropático y sistema circulatorio

Coinciden en la identificación molecular del P2Y12 el descubrimiento de la primera enfermedad hereditaria asociada a un receptor P2Y, y la asignación de la diana farmacológica a un fármaco utilizado durante muchos años contra el ictus cerebral y las etapas postinfarto como antiagregante plaquetario, me refiero al clopidogrel, de nombre comercial Plavix.

La identificación del receptor plaquetario de ADP, como diana de los nuevos fármacos antitrombóticos abrió una nueva era en farmacología (Hollopeter et al., 2001).

El modelo de investigación donde se identificó el receptor P2Y12, fueron las plaquetas humanas que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis sanguínea y en donde anomalías en su actuación pueden llevar a la formación de trombos con oclusión vascular. El ADP interviene en la agregación plaquetaria mediante dos subtipos de receptores acoplados a proteínas G. El P2Y1, que está acoplado a la proteína G_q y moviliza el calcio intracelular necesario para cambiar la forma de las plaquetas e inducir agregación. El segundo receptor de ADP necesario para la agregación es el P2Y12 y está acoplado a la proteína G_i que media en la inhibición de la adenilato ciclasa y permite la reorganización del citoesqueleto de actina, reduciendo los niveles de AMPc. Este receptor resultó ser la diana para los fármacos antitrombóticos, tales como la ticlopidina y el clopidogrel. Al clonar este receptor y conocer su secuencia se pudo comparar con la de algunos pacientes con anomalías en la coagulación sanguínea y se observó por vez primera que algunas de las coagulopatías hereditarias se debían a las alteraciones en la secuencia del gen del P2Y12 (Hollopeter et al., 2001).

La caracterización molecular del P2Y12 ha permitido el desarrollo de mejores fármacos antiagregantes plaquetarios para tratar las enfermedades cardiovasculares. Es de destacar que el clopidogrel es un profármaco que al ser administrado necesita ser metabolizado en hígado para producir el metabolito activo. Por lo tanto la respuesta al clopidogrel depende de la presencia del citocromo P450, en los microsomas he-

páticos en este caso del CYP2C19, que presenta múltiples alelos con mayor o menor actividad metabolizadora. El metabolito generado se une irreversiblemente al receptor plaquetario bloqueando el receptor P2Y12 durante toda la vida de la plaqueta. Los efectos secundarios del clopidogrel movilizaron a los investigadores de las principales industrias farmacéuticas para buscar un inhibidor reversible y eficaz, con buena disponibilidad por vía oral. El resultado fue la síntesis del Ticagrelor, el primer compuesto que se une reversiblemente al P2Y12 y que se administra por vía oral (Husted & van Giezen, 2009; Michelson, 2009; Cattaneo, 2011).

Estudios recientes sobre el receptor P2Y12 han demostrado que pueden jugar un papel excepcional en el dolor neuropático. La evidencia científica la ha proporcionado la administración intratecal de los antagonistas MRS 2395, o el AR-C69931 MX, o bien la inyección del oligonucleótido antisentido del P2Y12, en todos estos ensayos se observó una supresión del dolor neuropático después de la lesión de los nervios espinales, o de la lesión parcial del nervio ciático (Kobayashi et al., 2008). La vía de señalización de la P38 MAPK está implicada en el proceso de desarrollo del dolor neuropático. Los animales genéticamente modificados P2Y12 $-/-$ no cubrieron las expectativas pues no fueron capaces de bloquear la alodinia táctil, ni tampoco de aumentarla o disminuirla cuando se produce la lesión de nervios periféricos. Existen muchas lagunas en el conocimiento de los mecanismos del P2Y12 en su actuación sobre el dolor, tal vez oscurecidos por su excepcional relevancia como receptor que al ser activado induce la agregación plaquetaria y cuyos antagonistas han proporcionado la más avanzada y eficaz farmacología para la prevención del ictus cerebral y el infarto de miocardio.

De todos modos sabemos muy poco de la expresión de los receptores P2Y12 en la placa de ateroma. Tomando como modelo las placas obtenidas después de aterotomía coronaria en los pacientes con infarto agudo de miocardio o con angina de pecho estable, se pudo demostrar que el receptor estaba muy incrementado en las placas provenientes del infarto agudo de miocardio y que podría servir para remover e inestabilizar las placas de ateroma (Lee et al., 2011). La pregunta es si los antagonistas del P2Y12, al mismo tiempo que reducen la formación

de trombos servirían para reducir los dolores debidos a la estrechez de los vasos y la falta de oxígeno, síntomas claros de la angina de pecho. Esta situación la viven los pacientes con dolor y de modo angustioso.

5.c) Acciones moduladoras de receptores P2Y sobre sistemas de señalización dolorosa

Hasta ahora analizamos los receptores purinérgicos P2 de modo independiente, pero la interacción con otros muchos sistemas de señalización es lo que realmente ocurre en un modelo complejo *in vivo*. Nosotros necesitamos ampliar nuestro conocimiento fragmentando el problema de modo que sea susceptible de someterlo a la experimentación mediante preguntas sencillas que nos produzcan resultados comprensibles. Pocas veces tenemos la suerte de poder analizar y comprender un modelo más complejo, pero cuando esto ocurre nos damos cuenta de las grandes posibilidades que existen y lo mucho que podremos obtener de ellas.

Una de las primeras evidencias de que los receptores P2Y podrían modular la señalización dolorosa la proporcionaron las astas dorsales de la medula espinal donde los receptores P2Y2 modulan la señal sensorial de los receptores pronociceptivos TRPV1, que son estimulados por capsaicina y por la sensación fisiológica de calor (Lechner and Boehm, 2004). El receptor P2Y2 se encuentra localizado en las neuronas somato sensoriales y son muy abundantes en los ganglios de las raíces dorsales. En los ratones deficientes P2Y2 *-/-*, la señal de calcio inducida por UTP está muy reducida y tanto la señal dolorosa inducida por calor como por capsaicina se ve reducida al carecer del receptor P2Y2 que es un modulador positivo de la señal al evitar la desensitización del receptor. Estos resultados muestran la importancia del receptor P2Y2 en la señalización dolorosa (Malin et al., 2008).

Otro ejemplo mucho más complejo y que muestra las sutiles y complejas posibilidades de interacción entre diferentes sistemas de neurotransmisión es el mecanismo por el cual los receptores P2Y pueden influenciar la señalización glicinérgica. Trabajo que fue posible gracias

a la colaboración con el grupo del profesor Cecilio Giménez y Carmen Aragón de la Universidad Autónoma de Madrid (Jiménez et al., 2011).

La glicina es un neurotransmisor en el sistema nervioso central, la retina y la medula espinal. Generalmente actúa a través de receptores ionotrópicos que son canales de cloruro y atenúan la señalización de modo similar a los receptores GABA-A mediante un potencial postsináptico inhibitorio. La glicina es además co-agonista en los receptores glutamatérgicos de NMDA que son excitadores. La concentración extracelular de glicina es el factor determinante de su actividad sobre los receptores y está bajo el control de los transportadores de membrana que son los auténticos limitadores de la acción de la glicina en el sistema nervioso. Los mecanismos que incrementan la glicina en las terminales sinápticas glicinérgicas de las astas dorsales de la medula espinal producen analgesia. La concentración extracelular de glicina está regulada mediante transportadores de glicina que son dependientes de sodio y cloruro, conocidos como GLYT1 y GLYT2, que se localizan en las terminales presinápticas de las neuronas glicinérgicas inhibitorias el GLYT2 y en las células gliales adyacentes a las sinapsis inhibitorias, el GLYT1. Este transportador GLYT1 también reduce la concentración de glicina en las sinapsis inhibitorias cerca de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), en los cuales la glicina es un co-agonista del mismo nivel que el glutamato para facilitar la transmisión sináptica excitadora. La administración a nivel de la medula espinal de los inhibidores de GLYT1, tales como: sarcosina, N-[3-(4-fluorofenil)-3-(4-fenilfenoxi) propil] sarcosina (NFPS) or (6-metoxi-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il metil) amino metilcarboxilic acid (ORG25935), y de los inhibidores de GLYT2: 4-benziloxi-3,5-dimetoxi-N-[1(dimetilaminociclopentil)-metil]benzamida (ORG25543) and (O-[(2-benziloxifenil-3-fluorofenil) metil]-L-serina) (ALX1393), producen efectos anti-nociceptivos en diversos modelos de dolor neuropático y crónico, así como en procesos inflamatorios agudos (Hermanns et al., 2008; Morita et al., 2008; Tanabe et al., 2008).

Los animales genéticamente modificados, KO de los transportadores GLYT1 y GLYT2 muestran un profundo efecto anti alodinia en los modelos de ligación de nervios periféricos y otros modelos de dolor neu-

ropático. Mientras que las acciones para calmar el dolor son mediadas por ambos transportadores sobre receptores de glicina, la coactivación del receptor NMDA modula las acciones antialodínicas de los inhibidores de GLYT1. Este transportador localizado fundamentalmente en glía es el que regula los niveles de glicina en las vías glutamatérgicas centrales, mientras que el transportador GLYT2 que tiene localización neuronal está fundamentalmente implicado en el reciclamiento de la glicina de la sinapsis inhibitoria. El hallazgo fundamental de nuestra investigación es que la estimulación de receptores purinérgicos P2Y mediante el análogo del nucleótido 2-metiloadenosina 5'-difosfato que actúa sobre los receptores activados por ADP, en los modelos de cerebro medio y médula espinal de neuronas en cultivo y en sinaptosomas de cerebro de adulto, produce la inhibición del transportador GLYT1 y la estimulación del receptor de NMDA mediante una regulación paracrina. Estos efectos están mediados fundamentalmente por los subtipos P2Y1 y P2Y13, ya que sus efectos son parcialmente revertidos por antagonistas específicos N(6)-metil-2'-deoxiadenosina-3',5'-bisfosfato y piridoxal-5'-fosfato-6-azo(2-cloro-5-nitrofenil)-2,4-disulfonato y son totalmente bloqueados por el antagonista general de los receptores P2Y, la suramina. El receptor P2Y12 también está implicado en la estimulación del transportador GLYT1. Utilizando aproximaciones farmacológicas y metodología de bloqueo de expresión mediante siRNA, fuimos capaces de elucidar el mecanismo molecular mediante el cual se regulaba la capacidad de los transportadores de glicina GLYT. La modulación tiene lugar a través de una cascada de señalización implicando la activación de la fosfolipasa C, la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato, la movilización intracelular de calcio, estimulación de la proteína quinasa C, estimulación de la óxido nítrico sintasa, formación de guanosina monofosfato cíclico y finalmente activación de la proteína quinasa G-I, PKG-I.

Los transportadores GLYT1 y GLYT2 muestran una notable diferencia en sensibilidad a esta regulación de la vía NO/cGMP/PKG-I, tanto en preparaciones derivadas de cerebro como en sistema heterólogos que expresan los receptores P2Y recombinantes. La sensibilidad al agonista 2-metiloadenosina 5'-difosfato sobre los transportadores GLYT1 y GLYT2 fue abolida por RNA interferentes (siRNA) que bloqueaban a la óxido nítrico sintasa. La complejidad del mecanismo indica que

la señal dolorosa en el sistema nervioso de los mamíferos es esencial para el mantenimiento de la integridad del individuo y que no existe una única vía y señalización, sino que esta es redundante y múltiple, lo que puede servir de base para el desarrollo de nuevos fármacos, pero también de lo peligroso de su bloqueo total. Los receptores P2Y juegan un papel modulador múltiple y son capaces de interactuar con muchos de los sistemas tanto de modo directo como a través de señalizaciones complejas, que necesitan conectar diversos tipos de células.

Hay una pregunta respecto al dolor que levanta suspicacias ¿Que es la fibromialgia? ¿Puede ser considerada como un nuevo mecanismo doloroso? ¿Qué vías utiliza y donde se origina? Es difícil medir y comprender ese dolor difuso de la fibromialgia, pero existe y puede llegar a ser inhabilitante. Recientemente el grupo del Profesor de Farmacología de la Universidad de Oporto, Dr. Paulo Correia-de-Sa, ha proporcionado evidencias de que los fibroblastos de los tejidos subcutáneos podrían jugar un papel esencial modificando sus propiedades en presencia de las sustancias proinflamatorias. Los cambios producidos en la expresión y función de los receptores P2Y12 y P2Y1, inducirían cambios en la morfología y elasticidad de los fibroblastos de estos tejidos conectivos, tensionando las terminales nerviosas, que se agudizaría con un tejido subcutáneo esclerotizante, estos estudios tienen el valor añadido de haber sido realizados en fibroblastos humanos procedentes de donantes de órganos (Pinheiro et al., 2013 a, 2013b).

Conclusión

El dolor en situaciones agudas nos avisa del peligro y a lo largo de la evolución hemos recogido y guardado muchas señales y las hemos catalogado como peligrosas: el calor, el frío intenso, las sustancias químicas irritantes, las lesiones epiteliales de contacto y abrasión, mecanosensibles etc... Leemos de este modo el entorno y sus garantías para permanecer en él. No siempre el dolor se corresponde con estas señales primarias y muchas veces la sensación dolorosa se deriva de la reorganización de nuestros sistemas aferentes y de defensa, que algunas veces son hiperactivos. La escasez de dianas para el tratamiento

del dolor neuropático y la necesidad de hacer frente a señalizaciones dolorosas que se imbrican con situaciones anímicas más complejas nos obliga a replantear el mecanismo de la señal dolorosa de modo más amplio y considerando el complejo camino de su percepción y procesamiento no solo a nivel periférico sino también a nivel central.

En este discurso he querido dejar constancia de que los receptores Purinérgicos, sobre todo las familias de receptores de nucleótidos P2X y P2Y son excelentes dianas para el tratamiento del dolor, el inflamatorio y el neuropático posterior a una lesión o situación inflamatoria crónica. El desarrollo reciente de nuevos agonistas y antagonistas permite augurar a los receptores P2X3 y P2X7 un gran futuro en tiempo inmediato y a los otros receptores P2X4, P2Y6 y P2Y12 en un futuro menos próximo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio MP, Burnstock G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.*; 64(3):445-75.
- 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.* 58(3):281-341.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.*; 32(1):19-29.
- Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, Galligan JJ. (2003). Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol.* 2003 Aug 15;551(Pt 1):309-22. Epub 2003 Jun 17.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.*; 371(6497): 519-23.
- Burgess G, Williams D. (2010) The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J Clin Invest.* 2010 Nov; 120(11):3753-9. doi: 10.1172/JCI43195. Epub 2010 Nov 1.

- Burnstock, G. 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: R.W. Straub & L. Boils (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach*, pp. 107-118. Raven Press, New York.
- Burnstock G, Kennedy C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 16(5):433-40. Review.
- Burnstock G. (2007a). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007 64(12): 1471-83. Review.
- Burnstock G. (2007b). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.*; 87(2):659-797. Review.
- Burnstock G. (2009a). Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. *Mol Pain.* 30;5:69.
- Burnstock, G. Purinergic receptors and pain. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1717-1735 (2009b).
- Burnstock G. (2012). Preface to special issue (Commercial Developments in Purinergic Signalling). *Purinergic Signal.* 2012 February; 8 (Suppl 1): 1. Published online 2011 November 24. doi: 10.1007/s11302-011-9275-2.
- Camilleri, M. Review article: new receptor targets for medical therapy in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31, 35-46 (2010).
- Carlton, S.M. & Coggeshall, R.E. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res.* 820, 63-70 (1999).
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):428-31.
- Chessell IP, Hatcher J, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CBA, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2005;114:386-396.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP. (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *26;407(6807):1011-5.*

- Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford AP. (2005). P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol*. 2005 Sep 1;567 (Pt 2):621-39.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*; 56(1):2-5.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):894-8.
- Darwin, C. (1982). *The Expression of the Emotions in Man and Animals* (Albemarle, 1872).
- Del Puerto A, Díaz-Hernández JI, Tapia M, Gómez-Villafuertes R, Benítez MJ, Zhang J, Miras-Portugal MT, Wandosell F, Díaz-Hernández M, Garrido JJ. (2012). Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *J Cell Sci*. 125:176-88.
- Devries MP, Vessalo M, Galligan JJ. (2010). Deletion of P2X2 and P2X3 receptor subunits does not alter motility of the mouse colon. *Front Neurosci*. 19;4:22.
- Díaz-Hernández M, Gómez-Villafuertes R, Hernando F, Pintor J, Miras-Portugal MT. (2001). Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits. *Neurosci Lett*. 2001 Apr 6;301(3):159-62.
- Díaz-Hernández M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT. (2002a). Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*; 42(1):20-33.
- Díaz-Hernández M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM. (2002b). Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Commun*; 295(4):849-53.
- Díaz-Hernández M, Sánchez-Nogueiro J, Pintor J, Miras-Portugal MT. (2004). Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther*. 311(3):954-67.

- Díaz-Hernández M, Sánchez-Nogueiro J, Miras-Portugal MT. (2006). Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci.* 30(1-2):177-80.
- Díaz-Hernández M, del Puerto A, Díaz-Hernandez JI, Díez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci.*; 121 (Pt 22):3717-28.
- Díaz-Hernández M, Díez-Zaera M, Sánchez-Nogueiro J, Gómez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23(6):1893-906.
- Díaz-Hernández JI, 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.* 33:1816-28.
- Díez-Zaera M, Díaz-Hernández JI, Hernández-Álvarez E, Zimmermann H, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT. (2011) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 22(7): 1014-24.
- Dolgin E. (2010a). Animalgesic effects. *Nat Med.* 2010 Nov; 16(11):1237-40.
- Dolgin E. (2010b). Animal testing alternatives come alive in US. *Nat Med.* 16:1348.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol.* 2007;151:571-579.
- Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Han P, Jarvis MF. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1203-1214.
- Engel T, Gómez-Villafuertes R, Tanaka K, Mesuret G, Sanz-Rodríguez A, García-Huerta P, Miras-Portugal MT, Henshall DC, Díaz-Hernández M. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during *status epilepticus* in mice. *FASEB J.* 26: 1616-28.
- Espada S, Ortega F, Molina-Jijón E, Rojo AI, Pérez-Sen R, Pedraza-Chaverri J, Miras-Portugal MT, 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.
- Ford AP, Cockayne DA. (2011). ATP and P2X purinoceptors in urinary tract disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):485-526. Review.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 2006 Aug; 452(5):513-37. Review.
- Gómez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT. (2001). Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem.*; 77(1):84-93.
- Gómez-Villafuertes R, del Puerto A, Díaz-Hernández M, Bustillo D, Díaz-Hernández JI, Huerta PG, Artalejo AR, Garrido JJ, Miras-Portugal MT. (2009). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *FEBS J.* 2009 Sep; 276(18):5307-25.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature.*; 460(7255):599-604.
- Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., García-Carmona, F. and Miras-Portugal, M.T. (1996). Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for mnemonic regulation. *J.Biol. Chem.*, 271: 1957-1965.
- Gualix, J., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (1999), Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 73, 1098-1104.
- Gualix J, Gómez-Villafuertes R, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT. (2003). Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem.* 87(1):160-71.
- Guile SD, Alcaraz L, Birkinshaw TN, Bowers KC, Ebdon MR, Furber M, Stocks MJ. Antagonists of the P2X7 receptor. From lead identification to drug development. *J Med Chem.* 2009;52:3123-3141. doi: 10.1021/jm801528x. [PubMed] [Cross Ref].
- Gum RJ, Wakefield B, Jarvis MF. (2012). P2X receptor antagonists for pain management: examination of binding and physicochemical properties. *Purinergic Signal.* 2012 Feb; 8(Suppl 1):41-56.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.*; 72(6):1447-56.

- Gutiérrez-Martín Y, Bustillo D, Gómez-Villafuertes R, Sánchez-Nogueiro J, Torregrosa-Hetland C, Binz T, Gutiérrez LM, Miras-Portugal MT, Artalejo AR. (2011). P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 286(13):11370-81.
- Hansen RR, Nielsen CK, Nasser A, Thomsen SIM, Eghorn LF, Pham Y, Schulenburg C, Syberg S, Ding M, Stojilkovic SS, Jorgensen NR, Heegaard AM. P2X7 receptor deficient mice are susceptible to bone cancer pain. *Pain.* 2011; 152:1766-1776.
- Henshall DC, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT, Engel T. (2013). P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus. *Front. Cell. Neurosci.* 26,7: 237-250.
- Hervás C, Pérez-Sen R, Miras-Portugal MT. (2005). Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol.* 70(5): 770-85.
- Hattori M, and Gouaux E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 485: 207-212.
- Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, Iwakura Y, Decker MW, Faltynek C, Sullivan J, Jarvis MF. Interleukin-1ab gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Br Res.* 2006;167:355-364.
- Inoue K, Tsuda M. (2011). Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. *Exp Neurol.* 2011 Sep 17. [Epub ahead of print].
- Inoue K, Tsuda M, Koizumi S.(2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci.* 2004 Feb; 94(2):112-4.
- Inoue K. (2006.a). The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther.* 2006 Jan; 109(1-2):210-26.
- Inoue K. (2006.b). ATP receptors of microglia involved in pain. *Novartis Found Symp.* 2006;276:263-72; discussion 273-81.
- Jiménez E, Zafra F, Pérez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT, Aragón C, López-Corcuera B. 2011. P2Y purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10712-24.
- Kaan TK, Yip PK, Patel S, Davies M, Marchand F, Cockayne DA, Nunn PA, Dickenson AH, Ford AP, Zhong Y, Malcangio M, McMahon SB. (2010).

- Systemic blockade of P2X3 and P2X2/3 receptors attenuates bone cancer pain behaviour in rats. *Brain*. 2010 Sep; 133(9):2549-64.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*; 460(7255):592-8.
- Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K. (2008). P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008 Mar 12;28(11):2892-902.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*. 2002;168:6436-6445.
- Lechner SG, Boehm S. (2004). Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic Signal*. 1(1):31-41.
- Lee CW, Hwang I, Park CS, Lee H, Park DW, Kang SJ, Lee SW, Kim YH, Park SW, Park SJ. (2011). Comparison of differential expression of P2Y₁₂ receptor in culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 108(6):799-803.
- Light AR, White AT, Hughen RW, Light KC. (2009). Moderate exercise increases expression for sensory, adrenergic, and immune genes in chronic fatigue syndrome patients but not in normal subjects. *J Pain*. 10:1099-112.
- Light KC, White AT, Tadler S, Iacob E, Light AR. (2012). Genetics and Gene Expression Involving Stress and Distress Pathways in Fibromyalgia with and without Comorbid Chronic Fatigue Syndrome. *Pain Res Treat*. 2012;2012:427869.
- León D, Sánchez-Nogueiro J, Marín-García P, Miras-Portugal MA. (2008). Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*.; 52(6):1148-59.
- León-Otegui M, Gómez-Villafuertes R, Díaz-Hernández JI, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT, 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.
- Malin SA, Davis BM, Koerber HR, Reynolds IJ, Albers KM, Molliver DC. 2008. Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. *Pain*. 2008 Sep 15;138(3):484-96.

- Marín-García P, Sánchez-Nogueiro J, Diez A, León-Otegui M, Linares M, García-Palencia P, Bautista JM, Miras-Portugal MT. (2009). Altered nucleotide receptor expression in a murine model of cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15; 200(8):1279-88.
- Masin M, Young C, Lim K, Barnes SJ, Xu XJ, Marschall V, Brutkowski W, Mooney ER, Gorecki DC, Murrell-Lagnado R. (2012). Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: Re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br J Pharmacol.*; 165(4):978-93.
- Messemer N, Kunert C, Grohmann M, Sobottka H, Nieber K, Zimmermann H, Franke H, Nörenberg W, Straub I, Schaefer M, Riedel T, Illes P, Rubini P. (2013). P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology* 73:122-37.
- Mogil JS. (2012). The surprising empathic abilities of rodents. *Trends Cogn Sci.* 16: 143-4.
- Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. (2009). Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain.* 2009 Apr 23; 5:20.
- Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, la Marca G, André E, Preti D, Avonto C, Sadofsky L, Di Marzo V, De Petrocellis L, Dussor G, Porreca F, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G, Nilius B, Geppetti P.(2012). The 'headache tree' via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain.* 2012 Feb; 135(Pt 2):376-90. Epub 2011 Oct 27.
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17(11):3016-28.
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Górecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F. 2009. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem.*; 284(38):25813-22.
- North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82(4): 1013-67.
- Ortega F, Pérez-Sen R, Delicado EG, Teresa Miras-Portugal M. (2011). ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7

- receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*;61(8):1210-21.
- Ortega F, Pérez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. (2010). P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*.;67(10):1723-33. Epub 2010 Feb 10.
- Ortega F, Pérez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT. (2009). P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox Res.*; 15(3):193-204.
- Ortega F, Pérez-Sen R, Miras-Portugal MT. (2008). Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem.* 104(1):62-73.
- Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, Wemmie JA, Blackshaw LA (2005). Different contributions of ASIC channels 1a, 2 and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54, 1408-1415
- Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Certal M, Costa C, Magalhães-Cardoso MT, Ferreirinha F, Costa MA, Correia-de-Sá (2013). Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y12 receptors activation. *Cell Commun Signal.* 18;11:70. doi: 10.1186/1478-811X-11-70.
- Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Certal M, Costa MA, Costa C, Magalhães-Cardoso MT, Ferreirinha F, Sévigny J, Correia-de-Sá P.(2013) Histamine induces ATP release from human subcutaneous fibroblasts, via pannexin-1 hemichannels, leading to Ca²⁺ mobilization and cell proliferation. *J Biol Chem.*; 288(38):27571-83.
- Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (1995) A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 895-902.
- Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (2000) Receptors for diadenosine polyphosphates P2D, P2YAPNA, P4 and dinucleotide receptors: are there too many? *TIPS*, 21, 135.
- Rau, K.K., Johnson, R.D. & Cooper, B.Y. Nicotinic AChR in subclassified capsaicin-sensitive and -insensitive nociceptors of the rat DRG. *J. Neurophysiol.* 93, 1358-1371 (2005).
- Río-Hortega P del. 1920. El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol.* 9: 154.

- Río-Hortega P del, Penfield W. 1927. Cerebral cicatrix: the reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Bull. John Hopkins Hosp.* 41: 278-303
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.*; 452(5):486-500.
- Robertson SA, Lascelles BD. Long-term pain in cats: how much do we know about this important welfare issue?. *J Feline Med Surg.* 2010 Mar; 12(3):188-99. Review.
- Salas E, Carrasquero LM, Olivos-Oré LA, Bustillo D, Artalejo AR, Miras-Portugal MT, Delicado EG. (2013). Purinergic P2X7 receptors mediate cell death in mouse cerebellar astrocytes in culture. *J Pharmacol Exp. Ther* 347: 802-15.
- Sánchez-Nogueiro J, Marín-García P, Miras-Portugal MT. 2005 Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett.*; 579(17):3783-8.
- Sánchez-Nogueiro J, Marín-García P, León D, León-Otegui M, Salas E, Gómez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT. (2009). Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem Int.*; 55(7):671-82.
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;105(15):5683-6.
- Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Herbert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E, Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, Woolf CJ, Peltz G, Maixner W, Diatchenko L, Seltzer Z, Salter MW, Mogil JS (2012). Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med.* 18:595-599.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, et al. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276: 125-132.
- Sperlágh B, Zsilla G, Baranyi M, Illes P, Vizi ES. (2007). Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus. *Neuroscience.*; 149(1):99-111.

- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. (1996). The cytolitic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.*; 272(5262):735-8.
- Trang T, Beggs S, Salter MW. (2011). ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Exp Neurol.* 2011 Nov 16. Electronic version.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* 2003 Aug 14;424(6950):778-83.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci.* 2005 Feb; 28(2):101-7. Review.
- Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2013). P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front cell Neurosci.* 28,7:191.
- Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., Rassendren, F., 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* 28, 11263-11268.
- Ulmann, L., Hirbec, H., Rassendren, F., 2010. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* 29, 2290-2300.
- Vacca F, Giustizieri M, Ciotti MT, Mercuri NB, Volonté C. (2009). Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X receptor. *J Neurochem.* 109(4):1031-41.
- Vacca F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonté C. (2004). P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res.*; 76(5):653-61.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature.* 371(6497):516-9.
- Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, Bodin P, Bardini M, Cockayne DA, Ford AP, Burnstock G. (2001). P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neurosci.* 2001 Aug 1;21(15):5670-7.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits

- in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*. 1997 Sep; 36(9):1229-42.
- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*. 324(2):219-25.
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, Taper J, Gallo J, Manoharan A. (2002). A loss-of-function polymorphic mutation in the cytosolic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet*.; 359(9312):1114-9.
- Wolf G, Yirmiya R, Goshen I, Iverfeldt K, Holmlund L, Takeda K, Shavit Y. Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. *Pain*. 2004;104:471-480.
- Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S. (2008). Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res*. 15;1194:45-55
- Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schluesener HJ. (2008). Mechanical allodynia and spinal up-regulation of P2X4 receptor in experimental autoimmune neuritis rats. *Neuroscience*. 2008 Mar 18; 152(2):495-501.

ÍNDICE

Discurso de presentación a cargo del Académico Numerario Excmo. Sr. Don Joan Guinovart Cirera.....	5
Discurso leído en el acto de ingreso del Académico Correspon- diente, Excma. Sra. Doña M. ^a Teresa Miras Portugal.....	13
Agraïments.....	15
Agradecimientos.....	16
1. Introducción.....	19
1.a) Elección del tema.....	19
1.b) Introducción aspectos generales.....	20
2. Problemas en la validación de nuevos fármacos y nuevas dianas para el tratamiento del dolor.....	22
2.a) Nuevos modelos de validación de analgésicos.....	23
2.b) Nuevas dianas para el tratamiento del dolor.....	24
2.c) Medicamentos licenciados para el tratamiento del do- lor en las últimas dos décadas 1990-2010: La cruda realidad.....	28
3. Dolor y sistema purinérgico.....	29
3.a) Receptores ionotrópicos de nucleótidos, familia P2X: Importancia de la Biología Molecular.....	31
3.b) Estructura cuaternaria de los receptores P2X.....	33
3.c) Importancia del receptor P2X3 y del P2X2 en el procesamiento de la señal dolorosa.....	35
3.d) Importancia del receptor P2X4 en la génesis y pro- cesamiento de la señal dolorosa: papel de la micro- glía.....	38

4.	Implicación del receptor P2X7 en procesos de señalización dolorosa.....	41
4.a)	Características del receptor P2X7	42
4.b)	Características farmacológicas del receptor P2X7	44
4.c)	Señalización del receptor P2X7	45
4.d)	Receptor P2X7: enfermedades neurodegenerativas y neuroreparación	47
4.e)	P2X7 génesis de señales nociceptivas y desarrollo farmacológico	52
5.	Receptores P2Y en la génesis y tratamiento del dolor	54
5.a)	Importancia del receptor P2Y6 en la microglía y la señalización dolorosa	57
5.b)	Receptor P2Y12, dolor neuropático y sistema circulatorio.....	58
5.c)	Acciones moduladoras de receptores P2Y sobre sistemas de señalización dolorosa.....	60
	Conclusión	63
6.	Bibliografía	64

