

**INSTITUTO DE ESPAÑA REAL ACADEMIA DE FARMACIA**

**FUNCIONES EXTRACELULARES DEL ADENOSÍN TRIFOSFATO, ATP, Y  
OTROS NUCLEÓTIDOS**

**Por la : Excma. Sra. Doña M<sup>a</sup>. Teresa Miras Portugal**

**Discurso leído en la sesión del día 25 de enero de 2001  
para su ingreso como Académico de Número y contestado por el**

**Excmo. Sr. D. Angel Santos Ruiz.**

**A Fernando mi esposo.**

**A Fernando y Alberto mis hijos.**

## INDICE

### Página

<b>Introducción.....</b>	
<b>1) Justificación del tema elegido.....</b>	
<b>2) Acciones extracelulares de la adenosina y el ATP, primeras evidencias. ...</b>	
<b>3) Almacenamiento y mecanismos de secreción de ATP y otros nucleótidos..</b>	
3.1.) Presencia de nucleótidos en orgánulos secretores y liberación exocitótica....	
3.2.) Transportadores vesiculares de neurotransmisores, transportador de nucleótidos.	
3.3.) Liberación de nucleótidos no exocitótica.....	
<b>4) El ATP como cotransmisor y nervios purinérgicos. ....</b>	
<b>5) Receptores “¿Purinérgicos?”: Receptores de adenosina y de nucleótidos. ..</b>	
5.1.) Subdivisión de receptores P1 y P2.....	
5.2.) Subtipos de los receptores P2 (nucleotídicos).....	
<b>6) Receptores P2Y metabotrópicos. Vías de señalización. ....</b>	
6.1.) Familia de receptores P2Y.....	
6.2.) Señalización por receptores P2Y.....	
6.3.) Agonistas y antagonistas de los receptores P2Y. ....	
<b>7.) Receptores P2X. Canales operados por ligando.....</b>	
7.1.) Estructura terciaria de las subunidades de los receptores P2X .....	
7.2.) Estructura cuaternaria de los receptores P2X, homo- y hetero-oligómeros..	
7.3.) Agonistas y antagonistas de receptores P2X, sitios de unión .....	
7.4.)- Distribución tisular y funciones fisiológicas de los receptores P2X.....	
<b>8) Función neurotransmisora de los diadenosina polifosfatos.</b>	
8.1) Receptores metabotrópicos e ionotrópicos específicos para los diadenosina polifosfatos.	
8.2) Receptores de diadenosina polifosfatos en terminales presinápticas de cerebro.	

8.3.) Presencia de receptores ionotrópicos para ATP y dinucleótidos en terminales sinápticas aisladas.

### **9) Inactivación de la señal: Metabolismo extracelular del ATP y otros nucleótidos, ecto-nucleotidasas.**

9.1.)- Familia de las E-NTPDasas: Ecto-nucleotidotrifosfo y difosfo hidrolasas.

9.2.)- Familia de las E-NPP: Ecto-fosfodiesterasas.

9.3) Ecto-5'-nucleotidasa.

9.4) Metabolismo extracelular de los diadenosina polifosfatos

9.5) Otras actividades ecto-nucleotidásicas.

9.6) Aspectos fisiopatológicos de las ecto-nucleotidasas.

### **10) Perspectivas futuras**

### **Bibliografía**

**Contestación al Discurso de ingreso a cargo del Excmo. Sr. D. Angel Santos Ruiz.**

Discurso de la Excma. Sra. Doña. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.

Excmo. Sr. Director.

Excmas. Señoras y Señores Académicos

Señoras y Señores.

Quisiera que mis primeras palabras expresaran de modo claro y sencillo el profundo agradecimiento a todos los Académicos de esta Real Corporación por su generosidad y benevolencia al aceptarme entre sus miembros como Académico de Número de la Real Academia de Farmacia. Consciente de mis limitaciones quisiera tomar prestadas las palabras a Don Francisco de Quevedo, donde dice que: “...*no rechaza gran mar fuente pequeña...*”. Procuraré no defraudar la confianza que en mí han depositado y hacerme digna de tan alto honor.

La Medalla nº 48, por ser de nueva creación me exime de expresar el merecido recuerdo y laudatio de mi predecesor, por lo que quisiera dedicarlo a aquellos de mis Maestros, que tanto en la Universidad de Santiago de Compostela, como en Madrid fueron miembros de esta Real Corporación y ya no se encuentran entre nosotros.

Deseo expresar mi gratitud a los Excmos Señores Académicos que han presentado mi candidatura: Excmo Sr. D. Angel Santos Ruiz, Excmo. Sr. Don Bernabé Sanz Pérez y Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez, quienes guiados por su generosidad mas que por mis méritos han facilitado que me encuentre hoy entre Vds. Permítaseme decir que el Excmo Sr. Don Juan Tamargo, es amigo y compañero de la Universidad Complutense, que admiro su profundo conocimiento de farmacología y fisiología cardiaca, de las que es uno de los más renombrados expertos. El Exmo. Sr. Don Bernabé Sanz, amigo y compañero de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, a quien admiro por su extensa labor investigadora en Nutrición y Bioquímica de los alimentos, y a quien me une, además, la lucha común y solidaria para incrementar el nivel docente e investigador en nuestra Facultad y en nuestra Universidad.

Finalmente, mi agradecimiento al Excmo. Sr. Don Angel Santos Ruiz, a cuyo Magisterio debo mi vocación bioquímica y a cuya Escuela me honro de pertenecer. Vd. ha sabido crear en el laboratorio de bioquímica más antiguo de este país, un foro de aprendizaje y debate, donde se ha estimulado la inquietud por la ciencia y por descubrir los caminos no escritos del conocimiento, impulsando la investigación en la

Universidad. Era Vd. conocedor por su propia experiencia y su visión de futuro de que esta es la vía indispensable para alcanzar una actualización permanente de la docencia y su adaptación a una sociedad en cambio permanente. El llegar hoy de su mano a esta Real Academia en que responde a mi discurso de ingreso, es un gran honor que agradezco del modo más sincero y de todo corazón.

La vieja Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, el Palacio de Fonseca, fue testigo de mi llegada a la universidad cargada de ilusión y de ignorancia, desde allí me trasladé a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, de ambas facultades conservo el recuerdo de excelentes y abnegados profesores, a los que he tratado de imitar en su compromiso con la calidad de la docencia y de la investigación. Con el paso de los años se hace evidente que el estar hoy ante Uds. se lo debo a mis Maestros, pero también a mis compañeros, colaboradores, doctores y becarios, pues el trabajo de investigación y la docencia en ciencias de la vida requiere de la generosidad, entusiasmo y buen hacer de todos nosotros.

A lo largo de mi trayectoria humana y científica he sido afortunada. He tenido la suerte de tener unos padres que eran conscientes del valor del estudio y la cultura para desarrollar una vida digna y útil. He contado con la ayuda constante de mi esposo durante nuestras tres décadas de vida común y con la comprensión de nuestros hijos Fernando y Alberto, para con mis largas estancias en el laboratorio.

## 1) Justificación del tema elegido

*...y a nuestra libre voluntad es dado  
numerosa elección, y transitoria,...  
Francisco de Quevedo (El parnaso)*

La importancia de la adenosina 5'-trifosfato, ATP, como elemento central en el metabolismo energético de todas las formas de vida ha retrasado sin duda el reconocimiento de sus efectos a nivel extracelular. El ATP, conocido como la moneda universal de energía libre, es esencial para realizar múltiples procesos celulares. Destacaremos entre ellos, la síntesis de macromoléculas a partir de precursores simples, el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana esenciales para el transporte de iones y metabolitos, la realización de trabajo mecánico en el movimiento celular, etc. Sin olvidarnos de que es el precursor de los eslabones del ARN y en su forma deoxiribosa del ADN. Además es un compuesto regulador de la función de múltiples proteínas intracelulares, ya sea como ligando alostérico, o como sustrato de proteínas quinasas.

Desde el punto de vista estructural, el ATP es un nucleótido que consta de una adenina, una ribosa y tres unidades fosfato unidos por enlace fosfoanhidrido, los cuales son ricos en energía libre. Su importancia como coenzima y su descubrimiento están ligados al estudio de los metabolitos fosforilados de las etapas de la glicolisis y la fermentación alcohólica. Se suelen citar los trabajos de Lohmann en 1929 y de Fiske y Subbarow de la misma fecha (1929), como los primeros en descubrir la estructura del ATP, no obstante contaron con la ayuda de un trabajo pionero publicado dos años antes por Embden y Zimmermann (1927), en el que describen la estructura de los ácidos adenílicos. En los años siguientes la importancia del ATP en el metabolismo intracelular se ve reforzada por la introducción de un nuevo concepto, el de “enlace fosfato de alta energía” descrito por Lippman en 1941.

La obtención de enlaces ricos en energía, en forma de ATP, ha sido uno de los temas centrales de la investigación bioquímica a lo largo de siete décadas y una de sus áreas de debate más fructíferas. Curiosamente la producción de ATP por fosforilación

dependiente de sustrato, en las etapas anaeróbicas de la glucólisis, frenó el rápido desarrollo del concepto quimiosmótico. La síntesis de ATP en la mitocondria requirió para su comprensión de un cambio de mentalidad y se constató que las cadenas de transporte electrónico eran capaces de transformar la energía química contenida en el potencial redox de los coenzimas reducidos, en energía física en forma de gradientes iónicos. En el reino vegetal, además del sistema mitocondrial, la energía lumínica era capaz de originar un gradiente de protones en el cloroplasto. Para transformar de nuevo la energía física generada como gradientes iónicos de concentración, en energía química, las ATPsintasas, ó ATPasas capaces de sintetizar ATP a partir de los gradientes de la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación resultaron ser sistemas altamente complejos, provistos de rotores moleculares en su estructura. Estos enzimas junto con las ATPasas de membrana capaces de generar gradientes iónicos hidrolizando ATP, nos indican las posibilidades de transformación de la energía que ocurren en los seres vivos y de la necesidad de disponer de compartimentos estancos rodeados de estructuras lipídoprotéicas para disponer de sistemas organizados que sean viables.

Después de este rápido resumen que refleja la importancia del ATP intracelular, no es de extrañar que el estudio de sus posibles acciones fuera de la célula, en caso de que las tuviera, resultaran poco relevantes para los investigadores de aquella época. Pero en esta última década las cosas han cambiado y desde entonces múltiples familias de receptores de membrana para nucleótidos han sido caracterizados. La amplia distribución tisular de estos receptores y las múltiples e importantes funciones que realizan a nivel de órganos y tejidos, que se empiezan a descubrir, auguran una intensa actividad en los próximos años en este área de investigación. Aunque lo que conocemos es todavía fragmentario, se puede intuir que las acciones extracelulares del ATP y otros nucleótidos no van a desmerecer de sus acciones intracelulares.

## **2) Acciones extracelulares de la adenosina y el ATP, primeras evidencias.**

*...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.  
José Angel Valente (Interior con figuras)*

Es un dato constante en la farmacología de principios de siglo, que continúa hasta entrados los años 50, que la mayoría de las sustancias constituyentes de los seres vivos que iba descubriendo la química biológica, se administraban a toda una serie de especies animales, y de preferencia humanos para ver si tenían algún efecto. No es de extrañar pues, que en una fecha tan temprana como 1920 Freund inyectara la adenosina en sangre y descubra que tiene efectos cardiovasculares disminuyendo la presión sanguínea, aunque de modo fugaz. La presencia de adenosina y AMP en sangre había sido descubierta por Bass en 1914. La confirmación de que las purinas y los ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) ejercían poderosos efectos farmacológicos en corazón y en músculo liso surge de los estudios de Drury y Szent-Györgyi publicados en 1929. Esta publicación se considera como el inicio del estudio sistemático de las acciones de nucleósidos y nucleótidos como agentes farmacológicos y fueron realizados fundamentalmente con extractos musculares enriquecidos en nucleótidos. No debemos olvidar que la estructura del ATP había sido descrita ese mismo año de 1929 por Lohman.

Estudios posteriores del grupo de Drury, utilizando compuestos nucleotídicos y nucleosídicos mas purificados, confirmaron la potente acción vasodilatadora sobre las arterias coronarias de estos compuestos (Bennet and Drury 1931; Wedd and Drury 1934). Las notables diferencias entre las acciones de la adenosina y el ATP sobre el corazón, fueron primero señaladas por Drury (1936) y posteriormente por Loewi (1949). Acciones sobre otros tejidos fueron también descritas, destacando la motilidad intestinal y la contracción uterina inducida por ATP (Deuticke 1932; Watts 1953). A lo largo de los años cuarenta y hasta final de los cincuenta, muchos de los estudios con los

nucleótidos de adenina y la adenosina fueron hechos directamente en humanos con alguna dolencia específica y generalmente de cierta edad, así como en los heridos de bala en la segunda guerra mundial (Green and Stoner 1950; Boettge et al 1957).

No quisiera finalizar este breve apartado histórico sin destacar que la primera evidencia indirecta del ATP como neurotransmisor en el sistema nervioso proviene de los experimentos de Pamela Holton, que demostró la liberación de este nucleótido durante la estimulación antidrómica de los nervios sensitivos (Holton and Holton 1953; 1954; Holton 1959).

Estos primeros estudios con nucleótidos tuvieron que hacer frente a la impureza de los compuestos disponibles y además a su rápida destrucción en medios biológicos. Los investigadores suponían que la destrucción era debida a la inestabilidad de los enlaces fosfodiéster, pero años más tarde se descubrió la presencia de enzimas hidrolíticos localizados en la superficie de las células, conocidas hoy en día como ectonucleotidasas. Estas enzimas hidrolizan los nucleótidos hasta el correspondiente nucleósido y han sido un serio obstáculo para poder atribuir las acciones observadas con el ATP al propio nucleótido, o a alguno de sus productos de hidrólisis. De este modo, el producto final de hidrólisis extracelular, la adenosina, recibió especial atención, siendo ampliamente reconocidos los trabajos del grupo de Berne y de Gerlach (Berne, 1963; Gerlach et al. ,1963). A pesar de la enorme relevancia fisiológica y farmacológica de la adenosina, su estudio nos alejaría del tema objeto de esta presentación y por ello nos centraremos en lo referente a los efectos extracelulares de los nucleótidos.

### **3) Almacenamiento y mecanismos de secreción de ATP y otros nucleótidos.**

La salida del ATP y otros nucleótidos al exterior celular para realizar funciones de señalización es conocida solo de modo parcial y la información procede fundamentalmente de los tejidos neurales y endocrinos.

#### **3.1.) Presencia de nucleótidos en orgánulos secretores y liberación exocitótica.**

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

La presencia de ATP en gránulos secretores se describió por primera vez en los gránulos cromafines de la medula adrenal, donde se encuentra almacenado junto con adrenalina y noradrenalina (Hillarp et al., 1955; Blaschko et al.; 1956, Winkler and Carmichael, 1982). Años más tarde, nuestro grupo descubre la presencia en estos orgánulos de los diadenosina polifosfatos, ( $Ap_nA$ ,  $n= 4-6$ ), siendo la primera vez que eran descritos en organelas de almacenamiento de tejidos neurosecretores (Rodríguez del Castillo et al., 1988; Pintor et al., 1992c). La concentración de ATP en estos orgánulos puede alcanzar el 0.2 M y la de las catecolaminas hasta 0.55 M. Los diadenosina polifosfatos están en concentraciones más reducidas, y pueden alcanzar hasta 5mM en el interior del gránulo. Estos compuestos coalmacenados son liberados conjuntamente al medio extracelular de forma exocitótica en presencia de calcio y pueden alcanzar en las proximidades de la zona de secreción concentraciones de mili y micro Molar para nucleótidos y dinucleótidos respectivamente (Pintor et al., 1991a; 1992a; 1992c).

Se ha descrito también la presencia de ATP, diadenosina polifosfatos y otros nucleótidos en los gránulos densos de las plaquetas donde están coalmacenados y son liberados conjuntamente con la serotonina durante la agregación plaquetaria (Holmsen and Weiss, 1979; Lüthje and Ogilvie, 1983, Schlüter et al 1994).

La presencia de ATP en vesículas colinérgicas fue descrito por vez primera en el órgano eléctrico del pez *Torpedo Marmorata* (Dowdall et al., 1974; Zimmermann and Denston, 1976; Zimmermann, 1978). En esta misma preparación nuestro grupo ha encontrado diadenosina polifosfatos, fundamentalmente Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, conjuntamente con ATP, ADP y GTP (Pintor et al 1992b). La liberación conjunta de ATP y dinucleótidos de terminales de cerebro medio de rata, por despolarización, y la liberación inducida por anfetamina en el medio de perfusión del neocórtex de rata consciente, apoyan el papel neurotransmisor de los nucleótidos y dinucleótidos en la neurotransmisión cerebral (Pintor et al., 1992a; Pintor et al 1995). En terminales más específicas, como son las colinérgicas del sistema nervioso central, purificadas por inmuno adsorción, también se ha descrito la liberación de ATP (Richardson and Brown, 1987).

El principio de Dale (1935), según el cual cada terminal nerviosa solo puede sintetizar, almacenar y liberar un único tipo de transmisor, frenó el estudio de las acciones del ATP en las terminales simpáticas y colinérgicas, como neurotransmisor de pleno derecho. Son los trabajos de Burnstock (1976a), los que demuestran que las terminales nerviosas pueden ser mucho más complejas, y que el ATP tenía una función neurotransmisora, acuñando el termino de **cotransmisión**.

### **3.2.) Transportadores vesiculares de neurotransmisores, transportador de nucleótidos.**

Los nucleótidos, y otros neurotransmisores no peptídicos presentes en el interior de los gránulos necesitan unos eficientes sistemas de transporte, conocidos como transportadores vesiculares. Todos los transportadores vesiculares emplean el gradiente electroquímico de protones generado por una H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar (V-ATPasa) para impulsar el transporte en contra del gradiente de concentración (Moriyama and Nelson, 1987; Apps, 1998; Forgac, 1999).

La mayoría de los transportadores vesiculares han sido caracterizados desde el punto de vista cinético y molecular (Masson et al. 1999). Este es el caso del

transportador vesicular de monoaminas, denominado así por su poca especificidad, ya que es capaz de internalizar dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina y otras aminas aromáticas, se designa con las siglas VMAT (vesicular monoamine transporter) y han sido clonadas dos variantes el VMAT-1 y el VMAT-2, este último más abundante en cerebro (Liu et al. 1992, Henry et al., 1994, 1998).

El transportador de acetilcolina, conocido como VAT (vesicular acetylcholine transporter) también ha sido clonado y presenta la peculiaridad de que la secuencia del gen se encuentra dentro de uno de los intrones del enzima de síntesis de acetilcolina, la colina acetiltransferasa, asegurando de este modo la expresión simultánea de las proteínas requeridas para la funcionalidad y especificidad de las neuronas colinérgicas (Béjanin et al. 1994).

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

El transportador de aminoácidos inhibidores, GABA y glicina, conocido como VIAAT (vesicular inhibitory aminoacid transporter), reconoce a los dos compuestos con similar afinidad y ha sido clonado recientemente (Sagné et al. 1998). El último transportador en ser plenamente caracterizado y clonado es el vesicular de glutamato, que define el fenotipo glutamatérgico en neuronas. Curiosamente este transportador había sido previamente caracterizado, como una proteína de membrana plasmática capaz de transportar fosfato inorgánico, dependiente del gradiente de  $\text{Na}^+$  (Bellocchio et al, 2000; Takamori et al. 2000)

El transportador vesicular de nucleótidos ha sido caracterizado fundamentalmente en dos modelos experimentales, los gránulos cromafines de la medula suprarrenal, que contienen también noradrenalina y adrenalina, y las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo Marmorata*, que contienen acetilcolina. En ambos modelos el transportador muestra baja especificidad y la dependencia de la componente eléctrica del gradiente de protones. No obstante la

necesidad de emplear nucleótidos radioactivos y su rápido metabolismo en contacto con los gránulos, han sido siempre un obstáculo para una adecuada caracterización del transportador (Weber and Winkler 1981; Luqmani, 1981; Bankston and Guidotti 1996).

La utilización de análogos fluorescentes del ATP, el eteno-ATP (1,N<sup>6</sup>-etenoadenosina trifosfato), ha permitido el análisis del transporte mediante técnicas de fluorescencia acopladas a HPLC. Esta metodología desarrollada enteramente en nuestro laboratorio ha permitido comprender desde el punto de vista cinético el comportamiento de los transportadores de nucleótidos, los cuales presentan una compleja cinética de saturación, que por su analogía con los enzimas histeréticos hemos denominado mnemónica (Ricard et al., 1977; Ricard and Cornish-Bowden, 1987). Este tipo de cinética permite cambios muy acusados en la afinidad por el sustrato para adaptarse al estado energético de la célula, actuando solamente cuando los niveles de ATP intracelular son muy altos (Gualix et al. 1996). Esta técnica fluorescente nos ha permitido utilizar la citometría de flujo para estudiar los transportadores de orgánulos subcelulares, que son poco abundantes, abriendo enormes expectativas de futuro (Gualix et al. 1999a). Otra ventaja de la técnica fluorescente, acoplada a HPLC, ha sido disponer de la suficiente sensibilidad para poder medir el transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas aisladas de cerebro, lo que ha permitido demostrar la gran analogía existente entre las vesículas de tamaño pequeño y los grandes orgánulos de almacenamiento, ambos, con la misma afinidad para los nucleótidos y el mismo perfil de saturación mnemónico (Gualix et al. 1999b).

Para estudiar el transporte de los diadenosina polifosfatos fue necesario sintetizar los dieteno derivados, que son fluorescentes. La combinación de las técnicas de fluorescencia y de cromatografía líquida de alta resolución, permitió la caracterización del transportador presente en los gránulos secretores de la medula suprarrenal, mostrando afinidades muy elevadas, 10-20 microM por estas sustancias, que son señales de estrés en el interior de la célula. Además, estudios de competición por sustrato demostraron que el transporte de los diadenosina polifosfatos se efectúa a través del transportador de nucleótidos, y solo un comportamiento mnemónico permite explicar las oscilaciones de afinidad necesarias para efectuar ambas tareas (Gualix et al. 1997). La falta de especificidad de todos los transportadores vesiculares de nucleótidos

estudiados hasta el momento, permite explicar que en el interior de los gránulos, se puedan acumular todos los nucleótidos, di- y trifosfato presentes en el citosol. Aunque la concentración en el granulo con respecto al citosol es de unas 30-40 veces mayor, las concentraciones relativas entre nucleótidos, se mantienen dentro y fuera del granulo. Este aspecto es relevante pues hay muchos receptores de nucleótidos cuyos mejores agonistas son nucleótidos diferentes al ATP. A pesar de la amplia distribución de orgánulos que contienen ATP, todavía no se conoce el transportador desde un punto de vista molecular, y es el único que no ha sido clonado hasta la fecha.

El almacenamiento en orgánulos y vesículas del ATP y otros nucleótidos, junto con otros transmisores aminérgicos, o colinérgicos, ha permitido el estudio de su liberación y comparar las concentraciones relativas presentes en el granulo y una vez estimulada la exocitosis.

### **3.3.) Liberación de nucleótidos no exocitótica.**

La liberación exocitótica está plenamente demostrada para los tejidos neurales y neuroendocrinos, pero hay múltiples evidencias de que otros tipos de células también liberan nucleótidos de modo no exocitótico en respuesta a una serie de estímulos. Dada la elevada concentración de nucleótidos en el interior de las células, que alcanza el milimolar, es lógico pensar que la lisis de la membrana plasmática liberaría al espacio extracelular una ingente cantidad de nucleótidos. Esta situación se produce en caso de traumatismos y tiene una enorme importancia en los procesos de inflamación, y posterior recuperación tisular, pero la situación que nos ocupa aquí es la salida no exocitótica, pero fisiológica y dependiente de estímulos. Las células de músculo liso y estriado, las epiteliales, endoteliales, los astrocitos y las neuronas por su zona post-sináptica, son capaces de liberar ATP de modo no exocitótico. No se conoce el mecanismo a través del cual el ATP atraviesa la membrana plasmática en estas células, pero se ha postulado la existencia de una serie de transportadores o canales que serían miembros de la superfamilia de proteínas ABC (ATP Binding Cassette). Entre sus miembros se encuentran las glicoproteínas P, conocidas también como MDR (Multidrug resistance), con varios genes que confieren resistencia a fármacos (Stein 1997); las que transportan el colesterol, ó el retinol en la membrana plasmática (Scott, 1999); las que

permiten la salida de cloruro y otros iones en los epitelios absortivos y pulmonares como la CFRT (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Tanto la MDR, como la CFRT, han sido propuestas como candidatas para realizar la salida no exocitótica de nucleótidos, pero no han conseguido demostrarlo plenamente, aunque es probable que pueda ser alguno de los múltiples genes que contiene esta familia y que está todavía pendiente de asignarle una función (Abraham et al.,1993; Reisin et al., 1994; Li et al., 1996; Gottesman et al., 1995; Schwiebert, 1999).

Sea cual fuere el mecanismo de salida del ATP y otros nucleótidos, a través de la membrana plasmática, hay tener en cuenta que puede ser un factor determinante en las supuestas acciones de otros compuestos, pues este nucleótido es un componente ubicuo en todos los sistemas biológicos. Será necesario conocer el funcionamiento y estructura de la/las proteínas de membrana que permitan su salida y los estímulos que lleven a su activación, para poder esclarecer todas las funciones mediadas por el ATP y otros nucleótidos todavía sin reconocer.

#### **4) El ATP como cotransmisor y nervios purinérgicos.**

La existencia de terminales nerviosas en el tracto gastrointestinal y en la vejiga urinaria que no satisfacían los criterios de las terminales colinérgicas o aminérgicas y por lo tanto no almacenaban o liberaban ninguna de estas sustancias, planteó la existencia de otros tipos de transmisores. Muchas sustancias se estudiaron como posibles candidatos, pero la única sustancia que satisfizo los criterios clásicos de un neurotransmisor fue el ATP y los trabajos fueron realizados en su gran mayoría por el Prof. Burnstock (Burnstock et al. 1970; 1972). A estos nervios se les denominó no-adrenérgicos, no-colinérgicos, conocidos por sus siglas NANC. Esta hipótesis rechazada por más de 10 años es ahora plenamente aceptada.

El concepto de cotransmisión ya ha sido enunciado en el epígrafe anterior, y surge del almacenamiento y liberación conjunta del ATP con los transmisores clásicos. La oposición a la salida y acción de dos sustancias transmisoras de modo conjunto provenía del principio de Dale (1935), según el cual, una neurona solo debería de contener un transmisor. Esta idea era plenamente aceptada y estuvo vigente hasta que Burnstock (1976a, 1976b) demuestra que dos sustancias liberadas de la misma terminal pueden actuar y tienen receptores sobre las mismas células postsinápticas.

El papel del ATP como cotransmisor está hoy día plenamente confirmado con en las terminales colinérgicas, sobre todo en las uniones neuromusculares en donde ATP y acetilcolina se liberan conjuntamente, como el órgano eléctrico del Torpedo, las terminales del nervio frénico en diafragma de rata, ó las terminales excitadoras en vejiga urinaria (Burnstock, 1982; Silinsky, 1975; Zimmermann 1978).

Las evidencias experimentales para el papel del ATP como cotransmisor en las terminales simpáticas, provienen fundamentalmente de los estudios en vaso deferente y en otras inervaciones noradrenérgicas de los vasos sanguíneos (Burnstock 1988).

Este concepto de cotransmisión que surgió inicialmente para buscar una función a los transmisores coalmacenados en las mismas vesículas, y liberados al mismo espacio sináptico, es hoy en día mucho más amplio, pues cierto tipo de transmisores puede difundir, e incluso el ATP y otros nucleótidos pueden salir de modo no exocitótico. En sucesivos epígrafes veremos la interacción de estos nucleótidos con múltiples neurotransmisores, con los que pueden o no estar coalmacenados, como es el caso de

los transmisores de naturaleza aminoacídica, sobre todo GABA y glutamato.

## **5) Receptores “¿Purinérgicos?”: Receptores de adenosina y de nucleótidos.**

La interrogación en el término purinérgico será aclarada plenamente mas adelante. No obstante al comienzo de este apartado es importante destacar, que si bien en el caso de respuesta a nucleósidos, la adenosina es el agonista fundamental y el único con relevancia fisiológica y contiene en su estructura una base púrica, no es este el caso de los receptores de nucleótidos, que pueden responder a los nucleótidos purínicos y/o pirimidínicos según el tipo de receptor. Por ello la P no significa forzosamente que la base que forma parte de la estructura sea una base púrica.

### **5.1.) Subdivisión de receptores P1 y P2.**

Los estudios de las respuestas mediados por adenosina y ATP en diversos tejidos, eran muy confusos en sus inicios, pues como hemos mencionado en el epígrafe 1, la pureza de los compuestos disponibles, junto con su rápida destrucción en medios biológicos hacían extremadamente difícil asignar una función fisiológica o farmacológica específica a cada uno de estos compuestos. Es de destacar la enorme relevancia que tuvo la cafeína para poder diferenciar netamente las acciones mediadas por adenosina de las mediadas por nucleótidos. Su efecto antagonista sobre todos los receptores de adenosina permite explicar su acción estimulante al nivel del sistema nervioso central y su amplio consumo (Fredholm et al. 1999). Un análisis en profundidad de la literatura existente hasta 1978, le permitió a Burnstock, proponer la subdivisión de los receptores purinérgicos en P1 y P2 (Burnstock, 1978). Los receptores P1 responden mejor a adenosina que a ATP ó ADP, sus efectos son antagonizados por metilxantinas, fundamentalmente cafeína y actúan sobre los niveles de AMPcíclico. Los receptores P2 responden mejor a ATP y a ADP, que a adenosina, no son antagonizados por metilxantinas y no producen efecto sobre los niveles de AMPcíclico, aunque son capaces en muchos sistemas de incrementar la síntesis de prostaglandinas. Actualmente a los receptores P1 se les denomina receptores de adenosina y existen cuatro tipos A1, A2a, A2b y A3. Esta subdivisión ha sido plenamente corroborada desde entonces. Los receptores de adenosina están presentes en prácticamente todas las células del

organismo, pero nosotros solo nos referiremos a ellos cuando sea necesario para comprender la posible modulación que ejercen sobre los receptores nucleotídicos.

## **5.2.) Subtipos de los receptores P2 (nucleotídicos)**

La existencia de distintos receptores de tipo P2, era considerado como muy probable en base a las curvas de dosis respuesta con los agonistas naturales ATP y ADP. Esta suposición se confirmó al disponer de análogos de nucleótidos, algunos de ellos no hidrolizables (ó hidrolizables con más dificultad), estudios de dosis respuesta con estos compuestos en diferentes órganos permitió a Burnstock y Kennedy en 1985 proponer la subdivisión de los receptores P2 en dos grupos, los P2X y los P2Y. Los receptores P2X eran activados por bajas concentraciones de los análogos de ATP:  $\alpha,\beta$ -meATP y  $\beta,\gamma$ -meATP, y se desensibilizaban después de activados. Los receptores P2Y no eran activados por los análogos citados anteriormente y el derivado 2MeSATP era el agonista más potente.

Posteriormente se describieron otros receptores, el específico para el ADP, que está presente en plaquetas y se denominó P2T (Hourani and Cusack, 1991), y el receptor específico para el ATP en su forma iónica ( $ATP^{4-}$ ), no asociado a  $Mg^{2+}$  que está presente en las células del sistema inmune y se denominó P2Z (Gordon, 1986). Al estudiar el efecto de otros nucleótidos trifosfato, se encontró que en algunas preparaciones los efectos del ATP y del UTP eran equipotentes, a ese tipo de receptores se les denominó P2U (O'Connor et al. 1991). Los adenina dinucleotidos, fundamentalmente el  $Ap_4A$  y el  $Ap_5A$ , actuaban a bajas concentraciones y sus receptores fueron denominados P2D y receptor de dinucleótidos (Miras-Portugal et al. 1996, Pintor and Miras-Portugal 1995).

Otros muchos receptores fueron propuestos, pero en ausencia de una buena batería farmacológica de agonistas y antagonistas, que sigue siendo casi inexistente hoy en día, la clasificación según investigadores del área, “parecía un paseo al azar por las letras del alfabeto”.

Esta situación cambia drásticamente cuando se clonan los primeros receptores

P2, que resultaron ser los antiguos P2U y P2Y, ambos miembros de la gran familia de receptores siete hélices transmembranares acoplados a proteínas G (Lustig et al. 1993, Webb et al. 1993). Es el único caso de familias de receptores en que la biología molecular toma la delantera a la farmacología para realizar una caracterización inicial. Un año mas tarde ocurre una situación idéntica con los receptores P2X, que resultan ser canales operados por ligando, ionotrópicos, pero con una estructura de sus subunidades aparentemente mucho más simple que los caracterizados hasta aquel momento, como los nicotínicos, o de glutamato (Brake et al. 1994; Valera et al. 1994). Se hace patente que era necesario un cambio completo en la nomenclatura y se dejan solamente dos grandes familias, la de los P2Y, metabotrópicos y la de los P2X ionotrópicos (Abbracchio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994; Burnstock 1997; 1998).

La aparición de receptores purinérgicos, P2, capaces de responder a UTP y UDP, que son pirimidinas, sugiere que el termino de receptores purinérgicos debe de obviarse para los receptores nucleotídicos, manteniendo el termino de receptores P2, pues la P significa tanto purina como pirimidina (Fredholm, et al., 1996).

## 6) Receptores P2Y metabotrópicos. Vías de señalización.

### 6.1.) Familia de receptores P2Y

Los receptores P2Y son proteínas que contienen entre 308 y 377 aminoácidos, pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranares y su estructura terciaria es similar a la de otros receptores acoplados a proteínas G. Hasta el momento han sido clonados en mamíferos, los receptores denominados con letras capitales, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>. El receptor de plaquetas denominado actualmente P2Y<sub>ADP</sub> y uno de los metabotrópicos para los adenina dinucleotidos, denominado P2Y<sub>ApnA</sub>, no han sido clonados todavía. El receptor p2y3 ha sido clonado en pollo, pero no en humanos u otros mamíferos y presenta cierta homología con el P2Y<sub>6</sub> de humanos. Los receptores P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>7</sub>, P2Y<sub>9</sub> y P2Y<sub>10</sub>, han sido clonados, pero a pesar de la homología de secuencia existen serias dudas de que sean receptores de nucleótidos. Concretamente, el receptor P2Y<sub>7</sub> ha sido identificado recientemente como un receptor de Leucotrienos, el LB4 (Yokomizo et al. 1997). Referente al receptor P2Y<sub>8</sub> este ha sido clonado del embrión de rana, pero no se ha podido encontrar uno homólogo en humanos (Bogdanov et al. 1997).

Dada la presencia de receptores P2Y en todas las células de animales vertebrados, en donde se expresa generalmente mas de un subtipo por célula, ha sido necesaria la expresión de receptores en líneas celulares carentes de respuestas a nucleótidos, para conocer su verdadero perfil farmacológico y sus verdaderos agonistas fisiológicos (Webb and Barnard 1999; Jimenez et al. 2000). Resulta sorprendente que el primer receptor clonado para ATP por Tania Web en el grupo de Eric Barnard, el P2Y<sub>1</sub> de pollo, una vez clonado el homólogo de mamífero, ha resultado ser un receptor con una acusada preferencia por el ADP, siendo el ATP un antagonista (Web et al., 1993; Leon et al., 1997).

Un aspecto importante de los receptores de nucleótidos es la relativa abundancia de receptores que responden a UTP. En el receptor P2Y<sub>2</sub>, clonado por el grupo de Brake, el ATP y el UTP son agonistas equipotentes y es el equivalente en la antigua nomenclatura al P2U (Lustig et al. 1993). Algo similar ocurre con el receptor P2Y<sub>4</sub> en el que también el ATP y UTP son equipotentes (Bogdanov et al., 1997). Finalmente el

receptor P2Y<sub>6</sub> es selectivo para el UDP. Por esas casualidades de la ciencia el último receptor clonado hasta el momento por el grupo de Boeynaems en Bruselas, el P2Y<sub>11</sub>, es el único para el cual el ATP es el mejor agonista fisiológico y el ADP apenas tiene efecto. En este receptor el UTP y el UDP carecen completamente de efecto (Communi et al. 1997).

La familia de receptores P2Y difiere de otras familias de receptores acoplados a proteínas G por la gran diversidad en la secuencia de aminoácidos que existe entre sus miembros. Por ejemplo los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> humanos, comparten solo un 33% de residuos aminoacídicos idénticos, a pesar de las similitudes en su perfil farmacológico. Las variaciones entre especies de un subtipo específico, muestran mucha más homología, es el caso del receptor P2Y<sub>1</sub>, que muestra un 83% de residuos idénticos entre la secuencia humana y la de pavo.

Una comparación detallada de la secuencia entre los distintos receptores P2Y, muestra que todos los receptores clonados hasta el momento poseen una mayor analogía en las secuencias de los dominios transmembranares, sobre todo en los segmentos TMs 3, 6 y 7, en las zonas próximas a los dominios intracelulares. Es probable que estas zonas estén implicadas en la transducción de la señal hacia el heterotrímero de la proteína G. Es de resaltar que los dominios extracelulares de los receptores P2Y, que son la zona de unión del ligando, son también las zonas donde existe una menor homología en la secuencia.

Actualmente no se han descrito todavía variantes de los receptores P2Y originadas por procesamientos alternativos de los RNAm. La existencia de polimorfismos genéticos ha sido descrita para el gen del receptor P2Y<sub>2</sub>, (Arg334-Cys334). La frecuencia del alelo conteniendo arginina es la más alta en la población europea. Estos alelos no muestran diferencia en la curva dosis respuesta a los agonistas, aunque si en el tiempo de respuesta, que es más lento en el alelo cys-334 (Janssens et al. 1999).

La mayoría de los genes que codifican para los receptores P2Y no tienen intrones, a excepción del P2Y<sub>11</sub>, que contiene un intrón que separa los tres primeros codones del resto de la secuencia codificante (Communi et al. 1997).

El mapeo de los genes de los receptores P2Y muestra que están ampliamente distribuidos en el genoma. El P2Y<sub>1</sub> humano se localiza en el cromosoma 3, en la región q25. El gen P2Y<sub>4</sub> humano se encuentra en el cromosoma Xq13. Los genes P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>, humanos, se encuentran en el cromosoma 11, en la región q13.3-14. Ambos genes están separados por menos de 4 centiMorgans. La proximidad de estos genes puede indicar una expansión relativamente reciente de esta familia de genes por duplicación. Ninguno de estos loci cromosómicos está correlacionado con enfermedades hereditarias (Somers et al. 1997).

## **6.2.) Señalización por receptores P2Y**

Todos los receptores P2Y que han sido clonados hasta el momento, son capaces de activar la fosfatidilinositol fosfolipasa C, originando un incremento en los niveles de inositol trifosfato (IP3), que van a producir una salida de calcio del retículo, con el correspondiente aumento de este catión en el citoplasma (Motte, et al. 1993; Harden et al. 1995; Schachter et al. 1997). El incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos va a producir la activación de las protein quinasa C (PKC) sensibles a calcio, de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, de los canales iónicos sensibles a este ion y de la formación de los factores relajantes derivados de endotelio entre otras posibilidades (Ralevic and Burnstock 1998). La vía de transducción de la señal parece depender no solamente del subtipo de receptor P2Y, sino también del tipo de célula que expresa el receptor (von Kügelgen and Wetter 2000).

Los diferentes subtipos de receptores P2Y muestran una alta variabilidad en la secuencia del tercer segmento intracelular y en la zona del carboxilo terminal, que son regiones implicadas en el acoplamiento a las proteínas G. Esto sugiere que los diferentes receptores P2Y se acoplan con diversos grupos de proteínas G. Los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>, parecen ser resistentes a la toxina pertúsica, indicando un posible acoplamiento a través de las proteínas G<sub>q/11</sub>. Mientras que los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y p2y<sub>8</sub> son inhibidos por la toxina pertúsica y parecen estar acoplados a través de G<sub>i/o</sub>. Los receptores acoplados a G<sub>i</sub> contienen un residuo treonina al final del tercer segmento intracelular, el cual solamente está presente en los receptores que

hemos citado como sensibles a toxina pertúsica (Communi et al. 1996, Janssens et al. 1999; von Kügelgen and Wetter 2000).

Para algunos receptores P2Y se ha descrito un acoplamiento dual, en algunas células a adenilatociclasa y en otras a la fosfolipasa C (PIPLC) (Boeynaems et al. 2000). El mejor conocido es el receptor P2Y<sub>11</sub> humano, que es el único de todos los P2Y clonados que puede activar la adenilatociclasa de membrana. Cuando este receptor se expresa en la línea tumoral de astrocitoma, 1321N1, el receptor activa la producción de IP<sub>3</sub>, mientras que, cuando se expresa en una línea de células de ovario de hamster, CHO-K1, incrementa la producción de AMPcíclico (Communi et al. 1997). En receptores de aves, concretamente en el tp2y que ha sido clonado de pavo, cuando se estimula por agonistas, se activa la fosfolipasa C (PIPLC) y al mismo tiempo produce una inhibición de la adenilatociclasa (Boyer et al 1993; 2000). La existencia de señalizaciones alternativas no mediadas por adenilato ciclasa o producción de IP<sub>3</sub>, también han sido descritas. Estas nuevas vías incluyen las quinasa dependientes del factor Rho, las quinasa activadas por mitogenos (MAPK), ERK etc... que pueden explicar los efectos de los nucleótidos sobre crecimiento y diferenciación celular (Neary et al. 1999; Delicado et al.2000).

Existen evidencias muy sólidas en la literatura de que los receptores P2Y pueden controlar canales iónicos. De todos modos, existen canales que son regulados por los niveles intracelulares de calcio y los receptores P2Y cuando se activan, producen IP<sub>3</sub>, que va a inducir la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo. Pero no es ese el mecanismo de actuación que nos atañe aquí, pues el que se ha propuesto es una acción directa de las subunidades βγ que forman parte del heterotrímero de la proteína G que al separarse de la subunidad α se uniría al canal correspondiente. Este tipo de acoplamiento ha sido frecuentemente observado cuando los receptores P2Y se expresan en neuronas, y son capaces de activar los canales de calcio voltaje dependientes (VDCC) de tipo N (Bogdanov et al. 1997). La importancia de las subunidades βγ en las proteínas G en la señalización purinérgica, ha sido puesta de manifiesto por nuestro grupo en los astrocitos cerebelosos, en los estudios de potenciación de la respuesta de los receptores P2Y, medidos por microfluorimetría en célula única. En este modelo experimental, todos los receptores que activan adenilato ciclasa pueden a través de las subunidades βγ potenciar la

respuesta de calcio mediada por receptores nucleotídicos, tanto de los P2Y<sub>1</sub> como de los P2Y<sub>2</sub> (Jiménez et al. 1999).

### **6.3.) Agonistas y antagonistas de los receptores P2Y.**

La secuencia de aminoácidos de los receptores P2Y al ser conocida, ha permitido realizar modelos moleculares basados en la conformación de la rodopsina y de la bacteriorodopsina que son homólogos estructurales por pertenecer a la familia de receptores de siete segmentos transmembranares. Los primeros modelos indicaban que el lugar de unión del ligando implicaba varios aminoácidos que forman parte de los segmentos transmembranares TMs 3, 5, 6 y 7. Mediante mutagénesis dirigida se comprobó que sustituciones en los segmentos indicados de aminoácidos polares por aminoácidos neutros disminuía la respuesta a estimulación por agonistas (Erb et al. 1995; Jiang et al. 1997; Moro et al. 1998). Especialmente relevantes en el reconocimiento de los grupos fosfato de los nucleótidos agonistas son los residuos cargados de la posición 21 del segmento transmembrana 6, TM6, en cuya posición existe siempre una lisina ó una arginina, cualquiera que sea el tipo de receptor P2Y. En la posición 5 del segmento transmembrana 7, TM7, existe una lisina en los P2Y que reconocen nucleótidos de uridina, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>, pero no en los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> que reconocen nucleótidos de adenina. De nuevo en el segmento transmembrana 3, TM3, en la posición 8, asistimos a una clara diferencia entre los receptores que reconocen nucleótidos de uridina que presentan una tirosina, que puede interaccionar mediante puente de hidrogeno con el uracilo, mientras que los que reconocen adenosina suelen tener aminoácidos menos voluminosos, que puedan formar igualmente puentes de hidrogeno, como son la histidina , o la treonina (Erb et al. 1995; Jiang et al. 1997). Mutagénesis dirigida a intercambiar estos aminoácidos puede alterar sensiblemente las afinidades por los nucleótidos de uridina y adenosina.

No solamente la base es importante en el reconocimiento de los agonistas, pues hay receptores que reconocen preferentemente el nucleótido difosfato, ya sea ADP ó UDP, frente a los nucleótidos trifosfato. El residuo arginina en la posición 21 del segmento transmembrana 6, TM6; favorece el reconocimiento de los nucleótidos trifosfato. Este residuo se encuentra en los receptores, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>11</sub>. Los

receptores que tienen mas afinidad por los nucleótidos difosfato, P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>6</sub>, tienen un residuo lisina en esa posición del segmento transmembrana 6 (Moro et al 1998).

La farmacología de estos receptores está muy poco desarrollada y en su mayoría son análogos de los nucleótidos. Muchos de ellos tienen el inconveniente de ser destruidos rápidamente por los enlaces fosfato que poseen. Incluso los compuestos en los que se ha sustituido el grupo anhídrido del enlace fosfodiéster por un grupo imido o metileno, acaban siendo degradados, aunque más lentamente por alguna de las innumerables ecto-nucleotidasas presentes en la superficie de la célula o en el plasma sanguíneo. Estas mismas enzimas pueden intercambiar grupos fosfato entre diferentes nucleótidos, resultando unos valores de afinidad muy alejados de los valores reales. Por ello es importante el poder realizar los experimentos en células o sistemas sometidos a perfusión continua que eliminen los metabolitos generados “in situ” y con compuestos altamente purificados.

En la familia de los P2Y hay dos aspectos importantes desde el punto de vista del perfil de los agonistas. El primero es que se pueden hacer dos grandes grupos, el del P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> que responden solamente a nucleótidos de adenina y son muy selectivos con la naturaleza de la base purínica, y todos los demás, que son activados por los nucleótidos de uridina y en menor medida por otros nucleótidos, incluidos los de adenina y de inosina. El segundo aspecto es que entre los receptores P2Y los hay que prefieren los nucleótidos difosfato (P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>6</sub>) y otros que prefieren los nucleótidos trifosfato.

En el grupo de los receptores que prefieren los nucleótidos de adenina está el P2Y<sub>1</sub>, el cual se clonó originalmente de cerebro de pollo embrionario, el receptor humano expresado en ovocitos de *Xenopus* o en células de mamífero se activa por ADP, ATP, 2-metilatio-ADP, 2-metilatio-ATP, ATP $\gamma$ S, pero no por nucleótidos de uracilo. El 2-metilatio-ADP es un agonista muy potente y los receptores de humano y de rata prefieren este compuesto a los nucleótidos trifosfato (Webb et al. 1993, Leon et al. 1996; Ralevic and Burnstock 1998). El RNAm de este receptor se expresa abundantemente en cerebro, corazón, músculo esquelético, endotelios vasculares y plaquetas sanguíneas (Leon et al. 1997; Kunapuli and Daniel 1998). Las propiedades del receptor nativo expresado en los tejidos se parecen mucho a las del receptor clonado expresado en sistemas heterólogos.

En el sistema vascular el receptor P2Y<sub>1</sub> media la liberación del factor relajante derivado de endotelios (NO). Este receptor es también esencial para que se produzca el cambio en la forma de las plaquetas inducida por ADP. *In vivo*, la falta de este receptor en ratones con el gen bloqueado, prolonga el tiempo de sangrado y evita el tromboembolismo inducido por colágeno (Leon et al. 1999).

El único receptor clonado hasta la fecha cuyo agonista fisiológico específico es el ATP es el P2Y<sub>11</sub> humano. Entre los análogos sintéticos destacan como agonistas el ATP $\gamma$ S y el 2-propiltio- $\beta,\gamma$ -diclorometileno-d-ATP (ARL 67085) (Communi et al. 1999).

Los receptores activados por nucleótidos de uracilo, fueron denominados inicialmente como P2u. La complejidad de sus respuestas inducía a pensar que existían varios subtipos de receptores (Mateo et al. 1996). Las técnicas de biología molecular permitieron clonar tres receptores distintos en humanos, cuya denominación actual es P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>, el P2Y<sub>3</sub> de aves se parece al P2Y<sub>6</sub> humano y el p2y<sub>8</sub> de *xenopus laevis* no tiene todavía un equivalente en mamíferos (Ralevic y Burnstock 1998). El P2Y<sub>2</sub> clonado de humano, rata y ratón, es activado por nucleótidos trifosfato, el UTP y el ATP son equipotentes, también puede ser activado por el diadenosina tetrafosfato, Ap<sub>4</sub>A, por el ATP $\gamma$ S y por el UTP $\gamma$ S, que son agonistas plenos. Las propiedades de este receptor expresado en diferentes modelos, son análogas a las que exhibe en tejidos nativos. Recientemente se ha demostrado que este receptor podría jugar un papel predominante en la regulación del transporte de iones en los epitelios de las vías respiratorias. Esta posibilidad ha sido confirmada en ratones transgénicos que tienen bloqueado el gen para este receptor, los cuales desarrollan una patología similar a la de la fibrosis quística, con poca secreción de iones que fluidifiquen el mucus bronquial (Cressman et al. 1999). No es de extrañar que sea una diana farmacológica preferente, fruto de ese esfuerzo se ha sintetizado un agonista específico para este receptor, el diuridina tetrafosfato (Up<sub>4</sub>U), que se empieza a administrar como aerosol a los pacientes de fibrosis quística, pues al activar el P2Y<sub>2</sub> de los endotelios respiratorios se incrementa el calcio en las células, y se produce la fosforilación por proteínas quinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y por proteína quinasa C (PKC) de la proteína de membrana que regula la salida de iones cloruro, la CFRT.

El receptor P2Y<sub>4</sub> de humanos muestra una fuerte preferencia por el UTP comparado con el ATP, pero en otras especies los dos nucleótidos son equipotentes. También son agonistas otros trinucleótidos, la diadenosina tetrafosfato (Ap<sub>4</sub>A) etc (Lazarowski et al.1995; Mateo et al. 1996). En condiciones de ensayo en las que se garantiza la pureza de los componentes, los dinucleótidos son inactivos. La distribución de esos receptores en el organismo es bastante restringida y su RNAm solo se expresa abundantemente en placenta y menor medida en el músculo liso vascular y pulmón (von Kugelgen and Wetter, 2000).

El receptor P2Y<sub>6</sub> humano y el de rata pertenecen a los receptores que prefieren los nucleótidos difosfato, concretamente el UDP, que es unas 100 veces más potente que el UTP. El ADP y el ATP son inactivos. El RNAm de este receptor se encuentra abundantemente repartido en el organismo (Nicholas et al. 1996).

De los otros receptores P2Y clonados en otras especies pero no en humanos citaremos solamente el p2y<sub>8</sub>, en el cual UTP,CTP, ATP, ITP, y GTP son agonistas equipotentes. Se ha sugerido que este receptor juega un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso de batracios (Bogdanov et al. 1997).

Excepto en el caso de los receptores P2Y<sub>2</sub> para los cuales existe actualmente un agonista sintético específico (Up<sub>4</sub>U), la detección del resto de los receptores P2Y existentes en los tejidos, tiene que ser deducida por combinaciones de estudios de respuesta y/o de los RNAm. Por el momento no existe ningún agonista que pueda atravesar los epitelios absortivos y la posibilidad de su uso en clínica está limitado a la utilización del Up<sub>4</sub>U, como agonista de los receptores P2Y<sub>2</sub> de las vías respiratorias, para fluidificar el mucus acumulado en la fibrosis cística (Cressman et al. 1999)

La situación con los antagonistas de los receptores P2Y es todavía más pobre, si cabe. No existen por el momento antagonistas que permitan diferenciar la familia P2Y metabotrópica de la P2X ionotrópica, ni tampoco entre subtipos de la misma familia P2Y. Por ello la caracterización de receptores requiere de una amplia combinación de agonistas y antagonistas. En medio de tanta dificultad, se han encontrado algunos

compuestos que permiten entrever un mejor futuro (Lambrecht et al. 1992). En el caso del P2Y<sub>1</sub>, se ha descrito que es inhibido por los nucleótidos bisfosfato, como la adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato (Boyer et al.1996, 1998). De toda esta familia de compuestos, el derivado 2'-deoxi-N<sup>6</sup>-metiladenosina-3',5'-bisfosfato (MRS 2179), ha resultado ser antagonista competitivo más eficaz con un valor de pA<sub>2</sub> de 6.99, es decir Ki aproximada de 10<sup>-7</sup> M (Camaioni et al. 1998). Este compuesto no actúa como antagonista sobre el P2Y<sub>2</sub>, y sobre el resto tiene unas afinidades entre tres y cuatro ordenes de magnitud menores (Boyer et al. 1998). El gran inconveniente de este compuesto es que también bloquea la respuesta del receptor P2X<sub>1</sub>, y es necesario descartar la presencia de este receptor ionotrópico, sobre todo en tejidos excitables (Jacobson et al. 1999).

Es de esperar que a lo largo de la próxima década, se conozcan mas miembros de la familia P2Y, los cuales no han sido todavía clonados, y que de todos ellos se conozca su distribución, control de su expresión génica y las patologías y disfunciones en las que pueden estar involucrados. Es de desear que los esfuerzos de los químicos orgánicos, bioquímicos y farmacólogos se vea recompensada con la obtención de agonistas y antagonistas específicos. Este es un requisito esencial para abordar su posible uso en farmacología clínica.

## **7.) Receptores P2X. Canales operados por ligando.**

Los receptores P2X son canales iónicos operados por ligando, en este caso por el ATP. La apertura de los receptores produce una rápida y selectiva permeabilidad de la membrana a los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , dependiendo de las subunidades de los P2X que constituyan el poro iónico (Edwards et al. 1992; Edwards and Gibbs, 1993; Dubyak and el-Moatassim, 1993; North 1996). El primer receptor, o subunidad, clonado de esta familia fue el P2X<sub>1</sub>, que fue clonado por el grupo de Alan North en Basilea, a partir del músculo liso del conducto de vaso deferente de rata (Valera et al. 1994). El segundo receptor clonado fue el P2X<sub>2</sub>, clonado a partir de las células PC12 de rata, que son homólogas tumorales de las células cromafines de la medula suprarrenal (Brake et al 1994). Tanto el P2X<sub>1</sub>, como el P2X<sub>2</sub>, al ser analizada su secuencia mostraron una aparente simplicidad, con solo dos dominios transmembranares y sin analogía de secuencia con otros receptores ionotrópicos, como el nicotínico, ó el de GABA, que cuentan con cuatro dominios ó hélices que atraviesan la membrana y son aparentemente mucho más complejos. Hasta el momento se han clonado siete miembros de esta familia, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> y P2X<sub>7</sub> (North and Barnard 1997; Ralevic and Burnstock 1998) Estos receptores se encuentran abundantemente distribuidos por los tejidos neurales y músculo liso y esquelético, donde actúan como neurotransmisores excitadores de acción rápida. El P2X<sub>7</sub> tiene unas propiedades diferentes, pues puede formar poros no selectivos de gran tamaño y se encuentra abundantemente en el sistema inmune y en la microglia. La estructura y función de los receptores P2X necesita ser analizada en el contexto de otros receptores o canales operados por ligando y de los canales iónicos dependientes de voltaje, ambas proteínas esenciales en la membrana plasmática de las células excitables (Nicke et al. 1999).

### **7.1.) Estructura terciaria de las subunidades de los receptores P2X**

Las características estructurales de los receptores P2X han sido deducidas de las secuencias de los receptores clonados. En realidad, no se puede hablar propiamente de receptores, si no de subunidades de un receptor oligomérico, como se verá mas adelante.

Las proteínas que constituyen las subunidades P2X contienen entre 379, la más pequeña

(P2X<sub>6</sub>) y 595 aminoácidos la más grande (P2X<sub>7</sub>). Los pesos moleculares oscilan en consecuencia entre 42.000 y 68.000 Da de peso molecular. La ausencia de señal en el N-terminal de estas proteínas, indica que la parte inicial de la molécula está hacia el citosol celular (Valera et al. 1994; Surprenant et al., 1995). Generalmente el dominio N-terminal contiene muy pocos aminoácidos, que oscilan entre 24 residuos el que menos (P2X<sub>3</sub>) y 31 residuos el que mas (P2X<sub>6</sub>) (Nicke et al. 1999).

Los estudios de hidrofobicidad de la secuencia indican también que todas estas proteínas de la familia P2X tienen dos dominios hidrofóbicos en alfa hélice, que constituirían las dos hélices transmembranares de anclaje y que formarían parte del poro iónico. Estas dos hélices se denominan M1 y M2 y flanquean un enorme segmento extracelular donde previsiblemente se debe de encontrar el lugar de unión del ATP y agonistas en general (North and Barnard 1997). Dado que un poro iónico necesita para su formación de mas de dos segmentos transmembranares, se deduce la necesidad de la participación de varias subunidades, que podrían ser o no idénticas, dando lugar lógicamente a homo- ó hetero-oligómeros. La situación de los dos segmentos transmembrana impone que el dominio C-terminal de la proteína se sitúe hacia el interior de la célula. Esta orientación ha sido también demostrada por estudios de inmunofluorescencia (Torres et al. 1998). La longitud del C-terminal citosólico de estas proteínas oscila ampliamente y puede tener tan solo 27 aminoácidos como el P2X<sub>6</sub>, o llegar hasta 239 como el P2X<sub>7</sub>. Además esta zona no presenta homología de secuencia entre las distintas subunidades P2X, por lo que se cree que algunas propiedades específicas de interacción con citoesqueleto o de regulación del poro, residen justamente en esa zona. Los primeros 400 aminoácidos de la secuencia, presentan entre todas las subunidades, desde la P2X<sub>1</sub> a la P2X<sub>7</sub>, un 30% de homología, lo cual tampoco es excesivo para una familia de proteínas (Brake et al. 1994; Ralevic and Burnstock 1998).

El dominio extracelular tiene una longitud muy similar en todas las subunidades P2X, entre 276 y 286 aminoácidos. Existen varias secuencias susceptibles de glicosilación (Asparagina-X-serina/treonina), cuyo numero varia entre las diferentes subunidades, destaca el P2X<sub>4</sub>, con hasta siete sitios posibles para anclar una cadena glucídica (Soto et al. 1996, 1997). Este dominio extracelular contiene 67 aminoácidos

que han sido conservados entre todas las subunidades. Entre ellos destacan: 10 residuos cisteína, que refuerzan la estructura terciaria en el espacio y son esenciales para la configuración del sitio de unión del agonista; seis residuos lisina y dos arginina, que sirven para reconocer y atraer los grupos fosfato, mediante interacciones iónicas, pues ambos están ionizados al pH de los fluidos extracelulares (North 1996, Nicke et al. 1999).

La estructura terciaria de las proteínas de la familia de los receptores P2X, con la presencia de solo dos segmentos transmembrana, es muy diferente de la de otros receptores operados por ligando y que son mejor conocidos, como el nicotínico de acetilcolina, el de serotonina 5-HT<sub>3</sub>, los de GABA-A y glicina, todos ellos con cuatro hélices transmembranares, ó los de glutamato ionotrópicos en donde la hélice M2 no llega a atravesar la membrana y forma un bolsillo hidrofóbico. No deja de sorprender que la estructura terciaria de los P2X se parezca más a la de los canales iónicos de la membrana con estructura más simple, y probablemente más antiguos desde el punto de vista filogenético, como son el canal epitelial de Na<sup>+</sup>, el canal de K<sup>+</sup> rectificador hacia dentro y el canal iónico mecano sensible de *Escherichia coli*, todos ellos conteniendo solamente dos hélices transmembranares (Hucho et al. 1996; Costa, 1998).

## **7.2) Estructura cuaternaria de los receptores P2X, homo- y hetero-oligómeros.**

Los P2X clonados son plenamente funcionales, aun cuando se expresen en sistemas heterólogos, células distintas de la especie de procedencia, que pueden ser cultivos primarios, cultivos de células tumorales, o los ovocitos de *Xenopus laevis* que son muy utilizados. Las propiedades de estos receptores cuando se expresa una sola subunidad se parecen algunas veces a las de un tejido concreto, pero lo mas frecuente es que las propiedades de estos receptores se parezcan poco a las de los nativos, tal como se encuentran en los tejidos. Por ejemplo cuando se expresa solamente el cDNA del receptor P2X<sub>1</sub>, las propiedades son muy similares a las del receptor presente en el músculo liso del conducto deferente de rata (Valera et al. 1994). De modo similar La expresión del cDNA del P2X<sub>2</sub> produce unos receptores muy similares a los que se encuentran en el feocromocitoma de rata y en células noradrenérgicas de médula suprarrenal (Brake et al. 1994). No obstante cuando se expresa el P2X<sub>3</sub>, sus

propiedades, no son coincidentes con lo observado en ninguno de los tejidos que expresan esta proteína de forma abundante, como las neuronas sensitivas de los ganglios de las astas dorsales (Evans et al. 1996; 1998). De hecho estas neuronas expresan también las subunidades P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>4</sub> y cuando se expresan conjuntamente las subunidades P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub>, pero no la P2X<sub>4</sub> ó la P2X<sub>1</sub>, se obtienen unos receptores con propiedades similares a los presentes en las neuronas sensitivas. La amplia posibilidad de combinación de las subunidades para formar hetero-oligómeros, podría explicar la gran diversidad de las propiedades encontradas en los receptores nativos (Khakh et al.1995; Lewis et al. 1995; Torres et al., 1999). La asociación de subunidades diferentes se ha demostrado por co-precipitación con anticuerpos contra una de las subunidades (Radford et al. 1997).

Por ello es de suponer que en los tejidos los receptores funcionales son oligoméricos y que sus propiedades dependen de la combinación de subunidades diferentes (Lê et al. 1998, 1999). Por analogía con los receptores ionotrópicos de acetilcolina, glutamato ó GABA<sub>A</sub>, así como con los canales iónicos más sencillos, que hemos citado en el apartado anterior, es lógico suponer que las proteínas clonadas de la familia P2X<sub>1-7</sub>, necesitan asociarse entre si para formar receptores funcionales. La primera pregunta que surge es: ¿ Cuantas subunidades P2X necesitan interaccionar para formar el receptor funcional? Y la segunda pregunta es: ¿ Pueden todas las subunidades formar receptores homoméricos funcionales?.

Antes de conocer la secuencia y estructura terciaria de los receptores P2X, se pensaba que podría ser análogo a lo conocido del receptor nicotínico, con una estructura cuaternaria pentamérica. Una vez que las subunidades fueron clonadas, se observó que existía una gran semejanza entre el canal de potasio rectificador hacia dentro, que también posee dos hélices transmembranares, y en el cual el segmento transmembrana M2 es el que forma parte del poro iónico. Como este canal es de estructura tetramérica, con el poro formado por cuatro hélices M2 se pensó que podría ser esta la estructura de los receptores P2X funcionales. La expresión de distintas subunidades en ovocitos de *Xenopus*, y una vez expresada la proteína el tratamiento con reactivos bifuncionales, produjo compuestos con pesos moleculares que en electroforesis se correspondían con el peso molecular de formas triméricas (Nicke et al. 1998). Estudios de los receptores en

electroforesis no denaturantes, también coinciden con la naturaleza trimérica de los receptores P2X nativos (Nicke et al. 1999). La cuestión sigue en pie: ¿ Es el receptor funcional un único trímero, o una asociación de trímeros?. Todavía será necesario mucho esfuerzo antes de conocer la respuesta definitiva. Referente a la formación de homo-oligómeros, casi todas las subunidades pueden formar receptores funcionales cuando se expresan, los únicos que ofrecen problemas para formar homo-oligómeros son los P2X5 y P2X6, por lo que se piensa que en los tejidos donde se expresan, están formando parte esencialmente de hetero-oligómeros (Collo et al. 1996).

### **7.3) Agonistas y antagonistas de receptores P2X, sitios de unión**

En todos los receptores purinérgicos P2X, sean homoméricos, ó heteroméricos, el ATP es el agonista fisiológico más activo. Los valores de EC50 oscilan entre 1 microM y 10 microM, para todos, ellos, excepto para el P2X7, que tiene una menor afinidad (300 microM). El ADP, que es un nucleótido relativamente abundante y que además se origina a partir del ATP, una vez fuera de la célula por la acción de las ectonucleotidasas, solo presenta un modesto valor de EC50 por el receptor homomérico P2X1, y por alguno heteromérico donde participa este, por ejemplo el P2X1/P2X5. Ninguno de los otros nucleótidos presentes en la célula, como el UTP, CTP, ITP, GTP, o sus homólogos difosfato, tienen efecto agonista, ó antagonista.

La farmacología de los agonistas específicos para cada uno de los receptores y sus múltiples combinaciones no existe, pero el orden de potencia del ATP, 2MetilSATP (2MeSATP) y el  $\alpha,\beta$ -metilen-ATP, permiten establecer los rudimentos de una caracterización farmacológica. Por ejemplo el P2X1 tiene: ATP>2MeSATP>= $\alpha,\beta$ -meATP. En el receptor homérico P2X1 se ha descrito que los diadenosina polifosfatos, Ap4A, Ap5A y Ap6A, podrían ser agonistas, incluso con mayor afinidad que el propio ATP (North and Surprenant 2000). En algunos receptores el 2MeSATP es el mejor agonista, como es el caso de los P2X2, P2X3, y P2X6, y en algunos el  $\alpha,\beta$ -meATP es inactivo, como en el caso de los P2X2, P2X5, P2X6 y P2X7. Los sitios de los receptores P2X que forman el lugar de unión del ATP no son bien conocidos y no existe una clara homología de secuencia con otras proteínas que unen ATP. Una comparación reciente sugiere que existe una ligera similitud estructural con las aminoacil-tRNA sintetasas. En

todos los receptores en el dominio extracelular existe un residuo arginina que puede interactuar con el fosfato más próximo, el  $\alpha$ , mientras que el fosfato más distal, el  $\gamma$ , del ATP, podría interactuar con otros residuos lisina, arginina e histidina. Hay que recordar que en todas las subunidades P2X hay seis residuos lisina/arginina en posiciones conservadas en el ecto-dominio (Nicke et al. 1999).

La farmacología de los antagonistas P2X es exigua, aunque se están haciendo esfuerzos considerables, por las implicaciones de estos receptores en procesos de nocicepción, cardiovasculares etc. Los dos compuestos más empleados son la suramina y el PPADS. La suramina es un ureido benzil-naftaleno sulfónico, tiene alta carga negativa e inhibe a bajas concentraciones los receptores P2X, excepto el P2X<sub>4</sub> y el P2X<sub>7</sub>. El PPADS, que es el piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato, como su nombre indica un derivado del coenzima fosfato de piridoxal, pero con un grupo sulfónico, es mejor inhibidor que la suramina sobre todos los receptores, aunque su acción antagonista sobre el P2X<sub>4</sub> es escasa. Las zonas de interacción de los antagonistas con el ectodominio de las subunidades de los receptores P2X, muestra que los grupos sulfónicos interactúan con los residuos arginina y lisina, con los que interactúan también los grupos fosfato del ATP (Collo et al, 1996; Garcia-Guzman et al. 1997).

#### **7.4.)- Distribución tisular y funciones fisiológicas de los receptores P2X.**

Los receptores ionotrópicos de ATP, están ampliamente distribuidos en los tejidos neurales, endocrinos, músculo esquelético, músculo liso vascular y sistema inmune. El sistema nervioso es el que ha recibido mayor atención y es del que se dispone de un mayor bagaje de conocimiento, aunque es todavía muy parcial. La localización de los receptores P2X se ha realizado tanto mediante técnicas de hibridación "in situ" del RNAm específico, como con anticuerpos mediante inmunohistoquímica. El cerebro de rata es el mejor conocido y solo existen datos muy fragmentarios en otros mamíferos (Nörenberg and Illes 2000). El P2X<sub>2</sub> es el más abundante tanto en el sistema nervioso central como periférico, y su presencia ha sido descrita en el cortex cerebral, bulbo olfativo, núcleos del caudado/putamen, hipocampo (CA1-CA3), sustancia nigra, locus coeruleus, área tegmental ventral, etc. Nuestro grupo ha descrito la presencia de las P2X<sub>2</sub> y su funcionalidad en las neuronas de

Purkinje del cerebelo, donde se encuentra formando heterooligómeros con las subunidades P2X<sub>4</sub> y /o P2X<sub>6</sub> (Mateo et al. 1998). Es de destacar igualmente que en las neuronas CA1 de hipocampo de rata, en una colaboración que efectuamos con el grupo de Kristhal, se ha podido observar una corriente excitadora postsináptica mediada por receptores P2X. Curiosamente para observar esta corriente es necesario eliminar la señal de los receptores ionotrópicos de glutamato, pues este aminoácido es muy abundante en las preparaciones de cortes de tejidos, o sinaptosomales y enmascara las respuestas de otros compuestos fisiológicos (Pankratov et al. 1998). El P2X<sub>2</sub> es también muy abundante a lo largo de la médula espinal y sobre todo en las astas, en los nervios sensitivos y los ganglios asociados. Finalmente, el P2X<sub>2</sub> es el más abundante en los ganglios autonómicos y en el plexo mientérico, donde curiosamente es el único descrito (Nörenberg and Illes 2000). Parece existir una cierta correlación entre la expresión del P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>6</sub>, a lo largo y ancho del sistema nervioso central y periférico, en donde se ha demostrado que pueden formar heterooligómeros funcionales (Lê et al., 1998).

La subunidad P2X<sub>1</sub> tiene una distribución más restringida en el sistema nervioso, su presencia en cerebro parece limitada a las neuronas de la capa granular del cerebelo y algunas áreas del cortex. No obstante es más abundante en la médula espinal, nervios y ganglios sensitivos y ganglios autonómicos (Valera et al. 1994; Lê et al. 1999). En estos tejidos también se coexpresan otras subunidades, como la P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> y P2X<sub>5</sub>, todas ellas capaces de formar heterooligómeros (North and Surprenant 2000). Pero La presencia del receptor P2X<sub>1</sub> es muy acusada en músculo liso, en particular en la envuelta vascular. Estudios recientes en ratones con el gen bloqueado (P2X<sub>1</sub> knock-out), han confirmado el papel esencial de este tipo de receptor en la funcionalidad del músculo liso de vaso deferente. Los ratones carentes de este gen, pueden aparearse, y el semen es fértil *in vitro*, pero no pueden eyacular el líquido seminal durante la cópula y son estériles (Mulryan et al. 2000). Justamente en vaso deferente solo parece expresarse el receptor P2X<sub>1</sub> homomérico y no es de extrañar que su farmacología específica sea ambicionada por las compañías farmacéuticas, pues es una diana preferencial para la posible píldora anti-fertilidad masculina. Nuestro grupo ha sintetizado un derivado de los diadenosina polifosfatos, el diinosina pentafofato (Ip<sub>5</sub>I), que es un inhibidor potentísimo (K<sub>i</sub> = 6nM) del P2X<sub>1</sub> homomérico, tanto nativo en el tejido de vaso

deferente, como expresado en ovocitos (Pintor et al. 1997a; Hoyle et al. 1997; King et al. 1999). La presencia del P2X<sub>1</sub> en otros vasos, tanto venas, como arterias es muy desigual, baste citar que es apenas detectable en las grandes arterias mesentéricas y en las arterias cerebrales, donde son más abundantes el P2X<sub>2</sub> y el P2X<sub>4</sub> (Collo et al., 1996). Dependiendo de la estequiometría de las subunidades presentes en el oligómero, las arterias y venas pueden mostrar distinto fenotipo en las respuestas a los nucleótidos (Nicke et al. 1998; Torres et al. 1998; 1999).

La subunidad P2X<sub>3</sub> es según la bibliografía muy poco abundante en cerebro, únicamente en el núcleo del tracto solitario se expresa de modo detectable, pero sobre este dato incidiremos más adelante. En la médula espinal, el P2X<sub>3</sub> está preferentemente localizado en las astas dorsales y es sin duda la subunidad más abundante, junto con la P2X<sub>2</sub> en todo el sistema sensorial, incluyendo nervios y ganglios, también aparece en relativa abundancia en los ganglios autonómicos. La abundancia de esta subunidad en los nervios sensitivos, en las neuronas sensitivas de pequeño diámetro y vías implicadas en la nocicepción, tanto en el camino hacia la médula espinal y vías cerebrales, como en las terminales nerviosas periféricas, hacían de esta subunidad un candidato para diseñar nuevos analgésicos no opiodes (Lewis et al. 1995; North and Surprenant 2000). La obtención de un ratón con el gen que codifica la subunidad P2X<sub>3</sub> bloqueada (P2X<sub>3</sub> knock-out), demostró que esta subunidad es esencial para la transmisión de las señales sensitivas desde la piel hacia la médula espinal, pero contrariamente a lo previsto, parece estar implicado en la transmisión de señales de intensidad media, por ejemplo en las sensaciones térmicas en las que la temperatura oscila entre 20-40 °C y que se pueden considerar placenteras, pero su función en la sensación dolorosa térmica, en la que se llega a alterar la estructura del tejido colindante al nervio, todavía requiere un considerable avance del conocimiento (Souslova et al. 2000). Una importante función fisiológica del P2X<sub>3</sub> es su control del vaciamiento de la vejiga urinaria, en donde existe un gran número de terminales nerviosas con alto nivel de expresión de esta subunidad. El incremento del volumen de orina presiona el tejido epitelial induciendo una salida probablemente no exocitótica de ATP, este nucleótido es el que va a estimular los receptores de nucleótidos constituidos en gran medida por subunidades P2X<sub>3</sub> de las terminales, que miden la sensación de distensión y la necesidad de vaciado de la vejiga. En los animales con el gen P2X<sub>3</sub> bloqueado, la sensación de llenado y necesidad de

micción tarda más en producirse, lo que se está teniendo en cuenta para el desarrollo de una farmacología del control urinario, cada vez más necesaria en una población que envejece (Cockayne et al. 2000). En el apartado 8.3. dedicado al estudio de los receptores ionotrópicos de ATP y dinucleótidos en terminales nerviosas de cerebro, presentaremos datos relevantes que establecen claramente la presencia mayoritaria de las subunidades P2X<sub>3</sub> en las terminales nerviosas de cerebro medio, y su función en la señalización presináptica (Miras-Portugal et al. 2000).

Se cree que la subunidad P2X<sub>7</sub> no se expresa en neuronas, aunque se clonó originariamente del ganglio cervical superior y tejido cerebral. Esta subunidad presenta la particularidad de tener un gran dominio citosólico en el carboxilo terminal y no forma los clásicos canales operados por ligando, si no poros por donde pueden salir moléculas de hasta 2000 de peso molecular, según su diámetro, que se cree están constituidos por homopolímeros de P2X<sub>7</sub> (Collo et al 1997). La función de estos poros fue puesta de manifiesto en el sistema inmune, pues los poros inducidos por el ATP en las células que contienen estos receptores son citolíticos (Di Virgilio 2000). Curiosamente la subunidad P2X<sub>7</sub> es muy abundante en la microglía del sistema nervioso, cuando las condiciones del tejido cerebral son normales, se pueden considerar en reposo, pero en caso de lesión el ATP extracelular, si no es destruido rápidamente, puede causar la muerte de numerosas células de la microglía, de ahí que el ATP sea un poderoso citotóxico si sus niveles extracelulares no son controlados perfectamente en cerebro.

## **8) Función neurotransmisora de los diadenosina polifosfatos. Tipos de receptores.**

Los diadenosina polifosfatos (ApnA n = 2-6), son compuestos naturales que desarrollan un importante papel dentro de la célula, tanto a nivel de núcleo como del citosol (McLennan, 1992). Sus niveles se incrementan en situaciones de proliferación celular y estrés, que puede ser inducido por alta temperatura, metales pesados, agentes oxidantes etc., resultando en una estimulación de la duplicación y reparación del DNA (Rapaport and Zamecknick, 1976; Baker and Jacobson, 1986; Baxi and Vishwanatha, 1995).

Los ApnA son además potentes inhibidores de enzimas citosólicos que equilibran los nucleótidos mono, di y trifosfato en el citosol, tales como la adenilato quinasa y la adenosina quinasa (Lienhardt and Secemsky, 1973; Rotllan and Miras-Portugal, 1985). Datos recientes indican que algunas proteínas de la membrana plasmática en sus dominios citosólicos exhiben sitios reguladores, modulables por los ApnA. Entre estas proteínas es importante destacar los canales de K<sup>+</sup> regulados por ATP y el transportador de nucleósidos de la membrana plasmática de tipo neuronal (Delicado et al., 1994; Ripoll et al., 1996, Jovanovic and Terzic, 1996).

El transporte de ApnA a los orgánulos de almacenamiento impide que prosigan sus acciones a nivel intracelular y además proporciona un mecanismo para su posterior liberación por exocitosis controlada en los tejidos secretores. Las características del transporte de los diadenosina polifosfatos han sido comentadas anteriormente (Gualix et al., 1996, 1997). Los orgánulos subcelulares en los que hasta el momento se ha demostrado la presencia de los ApnA son: los gránulos densos de las plaquetas, los gránulos adrenérgicos y noradrenérgicos de la medula suprarrenal, y las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del torpedo (Lüthje and Ogilvie, 1983, Rodríguez del Castillo et al., 1988; Pintor et al., 1991a, 1992a, 1992b; Schlüter et al. 1994).

Una vez liberados al espacio extracelular, es interesante considerar las concentraciones que pueden llegar a alcanzar los ApnA, de este modo tendremos una visión mas lucida para separar lo que pueden ser las acciones fisiológicas, de las meramente farmacológicas. En las células cromafines estimuladas, los niveles alcanzan el microM en las zonas próximas a los lugares de exocitosis, niveles similares se alcanzan en las zonas donde se produce la agregación plaquetaria. Concentraciones mas

diluidas, en el rango nM son de esperar en zonas mas dístales y conforme actúen los ecto-enzimas específicos (Ogilvie, 1992; Pintor et al., 1991b). Valores en el rango del nM han sido también detectados en dializados de cerebro en perfusión, en animales estimulados con anfetamina (Pintor et al., 1995a).

Estudios de unión de ligandos y autoradiografía indican la existencia de varios sitios de unión, algunos con muy alta afinidad, con valores de  $K_d$  en terminales nerviosas de 0,1 nM, valores que están de acuerdo con los niveles esperables en esas áreas cerebrales. Estudios de autorradiografía han puesto de manifiesto que en cerebro existen zonas con gran densidad de marcaje, como son los caminos recorridos y los núcleos a donde llegan los nervios craneales, la capa granular del cerebelo y el hipocampo (Pintor et al., 1991b, 1993a; Walker et al., 1993; Rodriguez-Pascual et al., 1997).

Desde un punto de vista funcional, dada la analogía estructural que existe entre los ApnA y los nucleótidos de adenina, ATP y ADP, es posible que estos compuestos puedan actuar sobre los receptores de nucleótidos tanto de los P2X, como de los P2Y, por ello es necesario discernir claramente lo que van a ser acciones puramente farmacológicas, a través de otros receptores, de lo que van a ser acciones sobre sus receptores específicos (Abbracchio and Burnstock, 1994; Boarder et al., 1995; Fredholm et al., 1997). En el vaso deferente, donde se ha descrito la presencia del receptor P2X<sub>1</sub> en su forma nativa, los adenina dinucleótidos han demostrado ser agonistas, sobre todo el diadenosina pentafosfato (Ap<sub>5</sub>A), el mismo efecto ha sido observado en el homomérico P2X<sub>1</sub>, expresado en ovocitos (Hoyle et al., 1997; King et al. 1999). Otra posibilidad es que los diadenosina polifosfato se comporten como efectores alostéricos. Este es el caso para los receptores homoméricos P2X<sub>2</sub> expresados en ovocitos, en los cuales el Ap<sub>5</sub>A activa la entrada de calcio inducida por ATP en el rango nM bajo (Pintor et al., 1996).

El efecto de los diadenosina polifosfato también ha sido demostrada en los receptores metabotrópicos P2Y, concretamente en el P2Y<sub>1</sub> presente en células de endotelios vasculares bovinos y en el P2Y<sub>2</sub> clonado de pulmón de rata (Lazarowski et al., 1995; Mateo et al., 1996).

La existencia de receptores específicos para los diadenosina polifosfatos ha sido postulada por nuestro grupo y los argumentos a favor y en contra se desarrollan en el apartado siguiente.

### **8.1.) Receptores metabotrópicos e ionotrópicos específicos para los diadenosina polifosfatos.**

Los receptores de los diadenosina polifosfatos no han sido todavía clonados, pero por sus efectos específicos, que no pueden ser reproducidos con ningún nucleótido y las altas afinidades con que los realizan, se puede asegurar que son receptores para los dinucleótidos y no para los nucleótidos (Miras-Portugal et al. 1998, 1999, Pintor et al. 2000)

Al igual que ocurre con los receptores de nucleótidos, la existencia de dos familias, una metabotrópica y otra ionotrópica ha sido descrita. Debido a la multiplicidad de nombres que han recibido, ha surgido una cierta confusión en el área, que hemos procurado encauzar en una reciente revisión del grupo (Pintor and Miras-Portugal 2000).

Los datos que permiten afirmar la existencia de receptores metabotrópicos de diadenosina polifosfatos se derivan de los trabajos realizados en astrocitos y otras células gliales. En estas células el único compuesto dinucleotídico activo es el  $Ap_5A$ . y sus efectos fueron primero observados en la potenciación de la respuesta de calcio mediada por otros receptores nucleotídicos, estimulados a través de los receptores  $P2Y$ . La potenciación se producía a concentraciones en el rango nM de  $Ap_5A$  y para la respuesta producida por ATP, UTP, UDP y 2-me-SATP, lo que indicaba que este compuestos podían actuar a través de al menos tres receptores  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_4$ . Es de destacar que esta potenciación una vez establecida permanece durante al menos 6 horas, que es el tiempo máximo que puede permanecer una célula en el sistema de perfusión empleado para los estudios de respuesta en célula única. Estudios posteriores confirmaron la presencia de RNAm para los receptores  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  y  $P2Y_6$ . La

naturaleza del receptor y el segundo mensajero empleado por los receptores de  $Ap_5A$  es actualmente un área de intenso trabajo (Jimenez et. al., 1998, Jiménez et al. 2000).

En trabajos recientes hemos encontrado que la potenciación de la señal de calcio, también puede ser conseguida con el factor de crecimiento epidermal (EGF). Los receptores de EGF son tirosinquinazas, que estimulan las protein quinazas activadas por mitogenos necesarias para la proliferación y / o diferenciación celular. Este hecho nos ha permitido encontrar ciertas analogías con los receptores de los  $Ap_5A$ , pues activan las quinazas reguladas por señales extracelulares, las ERK1 y ERK2, de forma dosis dependiente y a concentraciones por debajo del nM, lo que indica que el efecto no es por así decirlo “farmacológico”, si no plenamente de acuerdo con las concentraciones fisiológicas esperables de estos compuestos en zonas alejadas de los lugares de exocitosis y con los valores de  $K_d$  de los sitios de unión de alta afinidad (Delicado et al.2000).

La existencia de receptores ionotrópicos para los dinucleótidos, fue descrita por vez primera en terminales presinápticos de cerebro medio de rata, en un principio los denominamos P4,pero actualmente y puesto que todavía no ha sido clonado es preferible denominarlo receptor de dinucleótidos (Pintor and Miras-Portugal 1995). La terminales presinápticas son las únicas en las que por el momento se ha logrado identificar este tipo de receptor. En células neurales en cultivo, como las neurocromafines, las de Purkinje ó las granulares de cerebelo no hemos conseguido por el momento identificar el receptor ionotrópico de diadenosina polifosfatos. En las células noradrenérgicas de medula suprarrenal se encuentran los receptores  $P2X_2$  sensibles a ATP, y en las de Purkinje también hay receptores ionotrópicos para ATP que contienen las subunidades  $P2X_2$ ,  $P2X_4$  y  $P2X_6$ , además formando receptores heteroméricos (Castro et al., 1995; Mateo et al., 1998).

## **8.2) Receptores de diadenosina polifosfatos en terminales presinápticas de cerebro.**

Las terminales presinápticas de cerebro, también conocidas como sinaptosomas son una preparación ampliamente empleada cuando se estudia el funcionamiento del sistema nervioso. Tienen la ventaja de su fácil preparación y manejo, pero el

inconveniente de su heterogeneidad, tanto en lo que se refiere a la naturaleza de los neurotransmisores que contienen, como al tamaño y presencia de receptores reguladores y moduladores a nivel presináptico.

La mayor parte de nuestros estudios en terminales sinápticas aisladas han sido realizados en las procedentes de cerebro medio de rata ó de otros mamíferos. La elección de este área se debe a que es muy rica en terminales aminérgicas y colinérgicas, donde, por analogía con el sistema nervioso periférico deberían de coalmacenarse los ApnA. En estas terminales el mejor efector es el Ap<sub>5</sub>A, que induce la entrada de calcio, solamente cuando existe calcio externo. La respuesta esta totalmente bloqueada en presencia de agentes quelantes de calcio como el EDTA, ó el EGTA. Las respuestas en los trasientes de calcio, inducidas por el Ap<sub>5</sub>A no son bloqueadas ni prevenidas por el tratamiento previo, ó desensitización cruzada con ATP, ó sus análogos no hidrolizables. Además estas respuestas no son bloqueadas por ninguna de las toxinas que bloquean los canales de calcio voltaje dependientes (VDCC), y solamente la  $\omega$ -conotoxina G-VI-A, que es una toxina que bloquea los canales de calcio tipo N, consigue reducir la segunda etapa de la respuesta que mantiene la entrada sostenida de calcio (Pintor and Miras-Portugal, 1995). Respuestas similares a las de cerebro de rata se encuentran en conejillo de indias, ratón ciervo, e incluso humanos, estos estudiados en un área diferente (Pintor *et al.*, 1995, 1997c, Pivorum and Nordone, 1996).

Los diadenosina polifosfatos no son los únicos agonistas de estos receptores ionotrópicos presinápticos, pues los dinucleótidos de guanina y los eteno derivados muestran efectos agonistas similares. En toda la familia de agonistas es necesario considerar dos parámetros, los valores de afinidad y los de respuesta máxima, pues no van conjuntamente. Los estudios de dosis respuesta indican el siguiente orden de potencia: Gp<sub>5</sub>G>Ap<sub>5</sub>A=Ap<sub>4</sub>A>Gp<sub>4</sub>G=ε-Ap<sub>4</sub>A=ε-Ap<sub>5</sub>A>Gp<sub>3</sub>G>Ap<sub>3</sub>A=ε-Ap<sub>3</sub>A.

El valor de respuesta máxima en calcio indica un orden diferente: Ap<sub>5</sub>A=Gp<sub>5</sub>G=ε-Ap<sub>5</sub>A>Ap<sub>4</sub>A=Gp<sub>4</sub>G=ε-Ap<sub>4</sub>A>Gp<sub>3</sub>G=Ap<sub>3</sub>A=ε-Ap<sub>3</sub>A. Cuando se considera el efecto máximo parecen existir tres familias que vienen definidas por la longitud de la cadena de fosfatos: Np<sub>5</sub>N>Np<sub>4</sub>N>Np<sub>3</sub>N.

En lo que podemos considerar un experimento afortunado en nuestro laboratorio, se sintetizaron los diinosina polifosfatos a partir de sus correspondientes homólogos adenina. La síntesis se llevo a cabo por desaminación enzimática no selectiva con el

enzima procedente de *Aspergillus sp.* Este enzima desamina todos los compuestos que contengan un grupo AMP en su estructura y se denomina adenilato deaminasa. El diinosina pentafofato, sintetizado a partir de  $Ap_5A$ , ha demostrado ser un poderoso inhibidor del receptor de los dinucleótidos de terminales sinápticas ( $IC_{50} = 4.2 \text{ nM}$ ), mostrando una afinidad 6.000 veces mayor que la mostrada por el receptor ionotrópico presináptico de ATP, que también se encuentra en esta preparación ( $IC_{50} = 27.7 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Pintor *et al.*, 1997a). El receptor ionotrópico presináptico de ATP presenta unas características similares a los de los  $P2X_3$  y por inmunohistoquímica se puede observar la presencia de estas terminales al menos en un 29 % del total de las terminales sinápticas de cerebro medio de rata (Miras-Portugal *et al.* 2000).

En vaso deferente de rata, donde los receptores son en su mayoría homoméricos para el  $P2X_1$ , el  $Ip_5I$  muestra un valor de  $pA_2$  de 6.4 (que es aproximadamente  $0.2 \text{ }\mu\text{M}$ ) con respecto al ATP (Hoyle *et al.*, 1997). Este efecto inhibitorio claramente confirma la existencia de receptores diferentes para el ATP y los  $Ap_nA$  en las terminales presinápticas.

A nivel de las terminales presinápticas existen una gran cantidad de receptores metabotrópicos que están implicados en la modulación de las terminales y sus respuestas secretoras. Esto sugiere la pregunta de si los receptores ionotrópicos de dinucleótido, que también son presinápticos, están modulados por la acción de otros receptores (Herrero *et al.*, 1992).

Puesto que los  $Ap_nA$  están co-almacenados con la mayoría de los compuestos aminérgicos y también con acetilcolina, compuestos que tienen receptores presinápticos bien identificados, parecía probable que existiera una modulación por la acción de protein quinasas acopladas a estos receptores (Richardson and Brown, 1987). Los estudios realizados con activadores directos de las protein quinasas y fosfatasa mostraron que los receptores ionotrópicos están estrechamente regulados por fosforilación /defosforilación, y que las situaciones que favorecen los estados de fosforilación, activando las protein quinasas A y C ( PKA , PKC) redundan en una menor entrada de calcio a las terminales sinápticas (Pintor *et al.*, 1997b). Al revés la inhibición de las PKA, ó PKC resulta en una mayor actividad del receptor de los

dinucleótidos. Esta situación es la opuesta para los receptores ionotrópicos presinápticos de ATP.

Estudios más detallados del control de los receptores de dinucleótidos muestran que los niveles extracelulares de ATP y adenosina, que son metabolitos originados del propio dinucleótido ( $Ap_5A$ ) por la acción de las ecto-nucleotidasas, pueden ejercer una precisa regulación del receptor, tanto en su efecto máximo, como en su afinidad por el ligando. La adenosina a través de sus receptores  $A_1$ , que inhiben la adenilato ciclasa e impiden el incremento de los niveles de AMPcíclico por otras señales, son capaces de incrementar la afinidad del receptor por su ligando hasta un valor de  $EC_{50}$  en el rango nM (Miras-Portugal *et al.*, 1998, 1999, Díaz –Hernandez *et al.* 2000a).

La inhibición de las protein fosfatasas por ácido okadaico, ó microcistina ( que es un mejor inhibidor de la protein fosfatasa 2A), y la ciclosporina-A (buen inhibidor de la protein fosfatasa 2B, también conocida como calcineurina), lleva a una drástica reducción en la entrada de calcio a las terminales, inducida por el agonista  $Ap_5A$ . Ambas protein fosfatasas 2A y 2B parecen pues desempeñar una relevante función recuperando los receptores una vez fosforilados, para que vuelvan a ser de nuevo, más activos y más afines.

### **8.3.) Presencia de receptores ionotrópicos para ATP y dinucleótidos en terminales sinápticas aisladas.**

Las técnicas de microfluorimetría acoplada con vídeo-imagen nos han permitido recoger las respuestas que producen diversos agonistas en una única terminal aislada. Los registros de calcio de esta terminal, identificada en la cámara de perfusión mediante un porta con rejilla microscópica, permite realizar tinciones de inmunohistoquímica después de los estudios funcionales y así caracterizar la presencia de diferentes receptores de membrana, o presentes en las vesículas sinápticas, como son los transportadores vesiculares de neurotransmisores, o proteínas específicas de las densidades pre- ó post-sinápticas.

Esta técnica ha sido desarrollada en nuestro laboratorio a partir de la de microfluorimetría en célula única aislada y generalmente en cultivo, para realizar estudios farmacológicos (Castro et al., 1995; Mateo et al., 1998). Mediante esta técnica hemos podido demostrar que en terminales nerviosos de cerebro medio de rata existen terminales que responden solamente a ATP (20%), otros que responden solo a Ap<sub>5</sub>A (15%) y otros que responden a ambos (13%). Estudios de inmunohistoquímica permiten decir que todos los terminales que responden a ATP contienen la subunidad P2X<sub>3</sub> posiblemente en combinación con otras subunidades que no son ni la P2X<sub>1</sub>, ni la P2X<sub>2</sub>, ni la P2X<sub>4</sub>, que son las subunidades para las cuales se dispone de anticuerpos (Miras-Portugal et al 1999, 2000; Diaz-Hernandez et al. 2000b).

Los receptores ionotrópicos para AP<sub>5</sub>A, pero no para ATP son muy abundantes en las terminales aminérgicas, sobre todo en las dopaminérgicas de los ganglios basales (Giraldez et al 2001). En las terminales colinérgicas de cerebro medio, caracterizadas después de los ensayos funcionales por inmunohistoquímica con anticuerpos contra el transportador vesicular de acetilcolina, hay un enriquecimiento de los receptores ionotrópicos para ATP y Ap<sub>5</sub>A comparando con la población general y además ambos compuestos son capaces de inducir la secreción de acetilcolina, con lo que demuestran ser funcionales (Miras-Portugal et al. 2000; Diaz-Hernandez et al. 2000b).

En terminales GABAérgicas, caracterizadas mediante anticuerpos contra el transportador vesicular de GABA y glicina, el transportador vesicular de aminoácidos inhibidores, los porcentajes de respuesta a ATP y Ap<sub>5</sub>A, son idénticas a las de la población general. Lo que es necesario resaltar es que tanto el ATP como el Ap<sub>5</sub>A, inducen la secreción de GABA de forma dosis dependiente y necesitan calcio para el proceso, lo que demuestra que es una liberación exocitótica del neurotransmisor a partir de vesículas (Gomez-Villafuertes et al. 2001)

Desde un punto de vista general, esta técnica microfluorométrica ha abierto nuevas posibilidades de estudio de la respuesta en terminales, y plantea una serie de preguntas acerca de la función que puedan tener los receptores ionotrópicos en las terminales presinápticas, pues su función parecía mas bien limitada a las áreas post-sinápticas. De todos modos, la presencia de receptores ionotrópicos presinápticos

también ha sido demostrada para otros neurotransmisores mas clásicos, como la acetilcolina, con la presencia de una gran variedad de receptores nicotínicos neurales, los receptores de glutamato, de GABA etc. (Wonnacott, 1997; Clarke *et al.*, 1997, Gu and MacDermott, 1997; Kaiser *et al.*, 1998).

En una reciente publicación de nuestro grupo describimos la existencia de receptores nicotínicos en las mismas terminales en que se encuentran receptores ionotrópicos para ATP, ó para los diadenosina polifosfatos (Miras Portugal et al. 2000). El hecho de que estos dos tipos de receptores sean ionotrópicos y permitan la entrada de calcio a la zona presináptica, debe de tener una razón fisiológica precisa, una de las primeras interpretaciones podría ser una cooperación de ambos receptores para potenciar la señal de calcio presináptica y por lo tanto modular positivamente la capacidad exocitótica de la terminal. Esta interpretación que parece tan razonablemente obvia podría no obstante estar alejada de la realidad, pues la coexpresión en ovocitos de *Xenopus* de los receptores nucleotídicos, conteniendo las subunidades P2X<sub>2</sub>, y de acetilcolina, el nicotínico con las subunidades  $\alpha 3\beta 4$ , resulta en una inhibición cruzada entre los dos canales cuando son funcionales (Khakh, et al. 2000).

La coexistencia de estos receptores ionotrópicos en las áreas presinápticas y sus interacciones mutuas será sin duda un área de debate y descubrimientos que permitirán entender como funciona la parte tal vez más delicada de una neurona y la que esta sometida a mayores alteraciones y disfunciones, con múltiples patologías asociadas (Khakh and Henderson, 2000). Solo desde un conocimiento profundo de la presinapsis y su complejidad se podrán entrever nuevas aproximaciones farmacológicas para paliar los efectos de las enfermedades neurodegenerativas asociadas.

## **9) Inactivación de la señal: Metabolismo extracelular del ATP y otros nucleótidos, ecto-nucleotidasas.**

La comunicación entre células, sean estas neuronas o no, requiere de un sistema eficiente de inactivación de las sustancias señalizadoras una vez que han acabado su función. Los mecanismos de inactivación pueden ser muy diversos, en el caso de los neurotransmisores de naturaleza aminérgica las terminales nerviosas disponen de transportadores altamente específicos con el propósito de recuperar solamente la amina que corresponde con esa neurona. Este es el caso de las terminales dopaminérgicas, cuyos transportadores solo reconocen dopamina, o las serotoninérgicas, cuyos transportadores hacen lo propio con la serotonina. Esto ha dado lugar a una poderosa farmacología centrada en la inhibición de los transportadores específicos, como es el caso de los antidepresivos que actúan inhibiendo el transportador de la serotonina. Una situación similar ocurre con los aminoácidos neurotransmisores, GABA, glutamato ó glicina, que disponen de transportadores altamente específicos y eficaces, para el respectivo aminoácido, en las células neurales.

Otros neurotransmisores son primero hidrolizados y son los productos de hidrólisis los que son capturados, como ocurre con los transmisores peptidérgicos y con la acetilcolina. La acetilcolinesterasa y las ecto-proteasas unidas a la membrana plasmática son elementos esenciales en el ciclo de los respectivos neurotransmisores. En el caso de los nucleótidos el sistema es más complejo, pues la hidrólisis de los nucleótidos trifosfato, origina nucleótidos difosfato que pueden ser incluso más activos sobre algunos receptores P2X ó P2Y. Además el producto final, la adenosina, tiene su propia familia de receptores con una amplia distribución en todos los tejidos del organismo. La adenosina es finalmente internalizada mediante un transportador de alta afinidad (Casillas et al. 1993, Pastor-Anglada et al. 1998, Sen et al. 1999). Una vez en el interior de la célula la adenosina es fosforilada por la adenosina quinasa, que es un enzima con una elevada afinidad. El producto originado, el AMP, entra a formar parte de la dotación nucleotídica de la célula, y se equilibra con otros nucleótidos mediante el enzima adenilato quinasa, estando disponible para volver a salir al espacio extracelular como ATP. A esta serie de etapas se las denomina ciclo ATP/adenosina (Zimmermann

1978; Rotllan and Miras-Portugal 1985).

Los primeros estudios para caracterizar las actividades enzimáticas de las ectonucleotidasas requerían el empleo de sistemas celulares intactos. La hidrólisis de los nucleótidos resultaba difícil de interpretar, pues generalmente todas las células de mamíferos contienen más de una actividad ecto-nucleotidásica y son capaces de hidrolizar tanto los nucleótidos tri-, como di- y monofosfato. La hidrólisis de los nucleótidos monofosfato, fue pronto asignada a un tipo diferente de enzima, la ecto-5'-nucleotidasa. En un principio se asignó la hidrólisis del ATP a una ecto-ATPasa y la del ADP a una ecto-ADPasa, pronto se vio que existían enzimas capaces de hidrolizar ambos y se denominaron ecto-ATPDasas, también conocidas como ecto-ATP difosfohidrolasas, ó ecto-apiratas. Debido a la baja especificidad por la base constituyente de los nucleótidos, en la actual nomenclatura se obvia el uso de ATP ó ADP hidrolasas, aunque este siga siendo su sustrato más abundante y probable en medios biológicos. Ecto-nucleotidasas capaces de hidrolizar los diadenosina polifosfatos, por lo tanto con actividad fosfodiesterasa, han sido caracterizadas por nuestro grupo y presentan unas propiedades muy diferentes en cuanto a requerimiento de iones, según se encuentren localizadas en la superficie neural, o en los endotelios vasculares (Rodríguez-Pascual et al. 1992 a, 1992b, Mateo et al. 1997 a, 1997b). Una mejor caracterización de la gran variedad de ecto-nucleotidasas existentes en las células ha sido posible con la ayuda de la biología molecular y pasaremos revista a las más importantes familias, a las que haremos referencia por su terminología actual.

### **9.1.)- Familia de las E-NTPDasas: Ecto-nucleótidotrifosfo y difosfo hidrolasas.**

Los enzimas que forman parte de esta familia hidrolizan tanto los nucleótidos trifosfato, como los nucleótidos difosfato y es frecuente encontrarlos citados en la literatura con diferentes nombres, como el de ecto-apirasa, ecto-ATPasa, ecto-ADPasa, por ello el nombre actual pretende dar cuenta de sus cualidades, que son la hidrólisis de los nucleótidos di y trifosfato, sin especial preferencia por la base purínica ó pirimidínica presente en ellos (Zimmermann 1994, 1996).

La NTPDasa es una familia muy amplia y se han descubierto en protozoos,

levaduras, plantas y animales tanto invertebrados como vertebrados. Los miembros de esta familia comparten cinco zonas muy conservadas que se corresponden con el centro catalítico. El primer miembro secuenciado y caracterizado de esta familia fue el CD39, curiosamente conocido como marcador de diferenciación linfocitaria (Maliszewski et al. 1994).

Desde el punto de vista estructural se pueden hacer dos grandes grupos con los componentes de la familia NTPDasa, según su modo de anclaje en la membrana, ya sea mediante uno o dos segmentos transmembranares, los cuales presentan una estructura en alfa-helice de naturaleza hidrofóbica. El dominio catalítico, con cinco zonas altamente conservadas se encuentra hacia el exterior celular.

Los miembros de la primera familia NTPDasa(1,2,3,4) tienen dos segmentos de anclaje en la membrana y los dominios amino y carboxilo terminales hacia el interior de la célula. Tienen unos pesos moleculares entre 50-60 kDa, deducido de su estructura primaria, en su forma deglicosilada, pero según las células en que se expresen varían las cadenas glucídicas y pueden alcanzar los 70-80 kDa (Christoforidis et al. 1995; Wang et al. 1998). Las afinidades de estas enzimas suelen estar en el rango microM alto en células intactas, pero cuando se expresan de forma única en sistemas celulares su afinidad parece más elevada con valores de Km en el bajo microM (Zimmermann 1999).

La NTPDasa1 es también conocida como CD39, ecto-apyrasa y ecto-ATPDasa. Todas estas denominaciones nos dan indicios de sus propiedades e historia. Es un enzima capaz de hidrolizar ATP y ADP con similar afinidad y velocidad y fue primero identificado como marcador linfocitario (Christoforidis et al. 1995, Wang and Guidotti, 1996; Kaczmarek y cols., 1996).

El segundo enzima en ser clonado y caracterizado fue la NTPDasa2, también conocida como CD39L1 y ecto-ATPasa. Este enzima, por contraposición al primero tiene mucha más afinidad por el ATP que por el ADP. En el caso del enzima humano, se han descrito diferentes secuencias, que son productos del procesamiento alternativo del mismo gen (Mateo et al. 1999).

El tercer enzima de la familia es la NTPDasa3, también conocida como CD39L3 y ecto-ATPDasa. Su afinidad por el ATP es ligeramente superior que por el ADP, pero no de modo tan acusado como en el segundo miembro de la familia. La secuencia de esta enzima es idéntica a la de la proteína HB6 humana, excepto por dos aminoácidos del extremo C terminal (Smith and Kirkley 1998).

El último miembro de la familia caracterizado por el momento, es la NTPDasa4, este enzima al contrario de las anteriores, tiene una marcada afinidad por los nucleótidos de uridina, tanto UTP como UDP. Curiosamente está localizada en la membrana del aparato de Golgi y su actividad es necesaria para procesar el UDP generado en las reacciones de transferencias de azúcares, activados como UDP-azúcar, que son necesarios para la síntesis de glicoproteínas en el lumen de dicho orgánulo (Wang and Guidotti, 1998, Zimmermann 2000). La estructura de este primer grupo de las NTPDasas, recuerda en su topología a la de los receptores P2X, además estas enzimas podrían estar asociados formando homo-oligómeros y el estado de oligomerización afecta la actividad catalítica.(Stout and Kirley 1996, Carl et al. 1998, Wang et al. 1998, Smith and Kirley 1999).

El segundo grupo de la familia de las NTPDasas, lo constituyen enzimas que están ancladas en la membrana a través de un único segmento y solamente el grupo amino terminal es citosólico. La NTPDasa5, denominada también CD39L4 tiene mayor afinidad y preferencia por los nucleótidos difosfato, se ha detectado en forma soluble en los medios de cultivo cuando se expresa en células de mamífero. La liberación del enzima soluble se puede bloquear inhibiendo la exocitosis celular constitutiva mediante el empleo de brefeldin, que también bloquea la liberación de las proteínas que forman parte de la matriz extracelular. Su presencia en el plasma sanguíneo y su predilección por los nucleótidos difosfato, como el ADP, hacen que se considere una diana de estudio preferente en la hemostasis y agregación plaquetaria (Mulero et al. 1999). El último miembro de esta familia en ser identificado es la NTPDasa6, también denominada CD39L2. El enzima ha sido clonado de una librería de cDNA humano pero todavía no ha sido caracterizada funcionalmente (Chadwick and Frischauf 1997, 1998).

## **9.2).- Familia de las E-NPP: Ecto-fosfodiesterasas.**

Esta familia de enzimas a la que actualmente se le denomina e-NPP, ecto-nucleótido fosfodiesterasa, ha recibido y todavía aparece con diversas denominaciones en la literatura, como son las de ecto-fosfodiesterasa, ecto-pirofosfatasa, PC-1, nucleótido pirofosfatasa. La nomenclatura actual de esta familia de enzimas ha sido propuesta por Zimmermann (2000). No existe una relación filogenética entre la familia de las E-NTPDasa descrita en el epígrafe anterior y la E-NPP. Las acciones enzimáticas que pueden realizar son como su nombre indica de rotura de enlaces fosfodiester, pueden pues hidrolizar el ATP, produciendo como productos de la reacción AMP y PPi. También pueden romper el enlace fosfodiester de los diadenosina polifosfatos, o de los coenzimas que contienen componentes nucleotídicos, como el NAD<sup>+</sup>, o de los azúcares activos unidos a los nucleótidos correspondientes, o incluso los nucleótidos cíclicos que puedan salir de la célula. Merece especial relevancia el que entre sus sustratos se encuentren los DNA ó RNA víricos presentes en los fluidos biológicos como resultado de una infección, evitando con su destrucción posibles transformaciones celulares y la propagación vírica (Goding et al. 1998). Además de la amplia especificidad de sustrato, los enzimas actúan mejor en condiciones alcalinas. Desde el punto de vista estructural, los enzimas están anclados por un único segmento hidrofóbico que atraviesa la membrana plasmática quedando el grupo amino terminal en el interior de la célula (van Driel and Goding 1987, Narita et al. 1994, Jin-Hua et al 1997). Presentan en su estructura sitios de reconocimiento e interacción con proteínas de la matriz extracelular y sitios susceptibles de ser hidrolizados por proteasas extracelulares, lo que da origen a las formas solubles que se encuentran presentes en plasma (Clair et al, 1997). Estos enzimas contienen además una secuencia consenso de unión de calcio, esta región es esencial para la actividad de este tipo de enzimas.

Hasta el momento se han clonado seis miembros de la familia de las E-NPP, las cuales fueron primero caracterizadas como marcadores de membrana con muy diversas funciones. El primer enzima en ser caracterizado fue la E- NPP1, a la que se denominó en un primer momento antígeno murino de diferenciación celular y PC-1 (van Driel and Goding 1987). La proteína tiene 905 aminoácidos y un peso molecular aparente de 115 kDa, suele encontrarse como dímero compuesto por dos subunidades iguales, también

puede encontrarse en forma soluble al ser hidrolizado por proteasas que rompen por una zona rica en cisteínas, que esta muy próxima a la zona del segmento transmembranar (Clair et al. 1997). El segundo miembro de la familia caracterizado en humanos es la NPP2, cuando se descubrió fue denominada PD-I $\alpha$  y también autotaxina, de este gen en humanos se originan varias proteínas que proceden de procesamientos alternativos del RNAm (Stracke et al. 1992, Murata et al. 1994). El tercer miembro de la familia que vamos a citar es el enzima NPP3. El cual ha sido denominado con anterioridad PD-I $\beta$ , B10 y gp130, estas tres denominaciones corresponden al producto del mismo gen y no se conocen procesamientos alternativos de su RNAm (Jin-Hua et al. 1997, Scott et al. 1997).

### **9.3) Ecto-5'-nucleotidasa.**

La ecto-5'-nucleotidasa fue primero conocida como una proteína marcadora de la superficie de los linfocitos maduros, tanto para los T como para los B, y se le denominó CD73. Esta anclada en la membrana plasmática a través de un glicolípido, el glicofosfatidilinositol o GPI. Este tipo de anclaje es susceptible de hidrólisis y origina las formas solubles que aparecen en el plasma sanguíneo. En la membrana forma dímeros que están estabilizados por puentes disulfuro. El peso molecular aparente para los monómeros oscila entre 62 kDa y 74 kDa, debido a la presencia de diversas cadenas glucídicas según el origen de especie y/o tisular (Zimmermann 1992).

Los enzimas clonados y secuenciados de mamíferos comparten un 85% de homología de secuencia entre ellas y un 60% con respecto a la aislada del pez torpedo, lo que indica que es una proteína altamente conservada entre los vertebrados (Misumi et al., 1990a, 1990b; Volkandt et al., 1991; Resta et al., 1993; Suzuki et al., 1993). En todos los vertebrados estudiados hasta el momento se ha encontrado un único gen que codifica la proteína. Enzimas relacionados se han encontrado en artrópodos, e incluso en arqueobacterias y eubacterias. Un cuidadoso estudio de la zona promotora del gen de la ecto-5'-nucleotidasa de mamíferos, ha demostrado que esta sometido a múltiples controles, para garantizar su presencia en las zonas donde es mas intensa la señalización por nucleótidos (Spychala et al. 1999).

El enzima cataliza la etapa final de destrucción de los nucleótidos monofosfato, produciendo el correspondiente nucleósido y fosfato inorgánico y es por lo tanto el enzima mayoritariamente responsable de la formación de adenosina a partir del ATP y ADP liberados. El valor de  $K_m$  por el AMP, esta en el micromolar bajo, indicando una alta afinidad por su sustrato. Los nucleótidos di y trifosfato son inhibidores y su actividad en células enteras es mas reducida que las de las ecto-NTPDasa y las ecto-NPP, con lo que el AMP suele tener una vida media en los fluidos biológicos mucho más larga que los nucleótidos más fosforilados (Torres et al. 1990; Rodriguez-Pascual et al, 1992a,1992b). Es un metalo enzima que contiene cinc en su centro activo y la estructura tridimensional determinada por rayos X muestra que está relacionada con la 5'-nucleotidasa periplásmica de *Escherichia coli* (Knöfel and Sträter 1999).

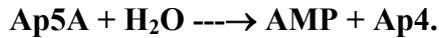
#### **9.4) Metabolismo extracelular de los diadenosina polifosfatos**

Los enzimas responsables de la hidrólisis extracelular de los diadenosina polifosfatos no han sido todavía bien definidos en términos moleculares. Algunos de los enzimas citados en el apartado de las ecto-enzimas con actividad fosfodiesterasa, E-NPP, pueden romper los enlaces fosfodiester de los dinucleótidos tanto de adenina (ApnA), como de guanina (GpnG), así como los coenzimas ( $NAD^+$ ) (Gasmi et al. 1998).

La existencia de ecto-enzimas capaces de hidrolizar los diadenosina polifosfato ha sido descrita en diferentes modelos celulares, como son, las células endoteliales de aorta (Goldman et al. 1986; Ogilvie et al., 1989), las células de los endotelios vasculares de medula suprarrenal (Mateo et al, 1997a), las células neurocromafines bovinas (Rodriguez-Pascual et al. 1992; Ramos et al. 1995, Gasmi et al. 1998) y en las membranas plasmáticas de terminales sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Mateo et al. 1997b). Estos enzimas presentan poca especificidad por la base constituyente de los dinucleótidos y por esa razón también se han denominado ecto-dinucleótido hidrolasas (E-NpnNasa). Todos estos enzimas se caracterizan por una rotura asimétrica de los dinucleótidos. Esta hidrólisis asimétrica origina el nucleótido monofosfato de uno de los extremos y el correspondiente nucleótido con numero de fosfatos n-1, p.ej. para el diadenosina tetrafosfato la rotura seria la siguiente:



Es de destacar que en el caso del Ap5A, que es igualmente abundante en vesículas de secreción, la rotura sería la siguiente:



El Ap4 ha demostrado ser un nucleótido más difícil de hidrolizar que el ATP ó el ADP por las ecto-NTPDasas, lo que resulta en una vida media mas larga en los fluidos biológicos. Además al Ap4 es un mejor agonista en los receptores P2X<sub>1</sub>, que el propio ATP y que se forma directamente en las terminales nerviosas (Bailey and Hourani 1995, Lee and cols, 1995a, 1995b; Gómez-Villafuertes et al. 2000).

Los valores de Km de las ecto-dinucleótido hidrolasas están en el entorno de 1 a 0.1 microMolar y parecen bien adaptados a las posibles concentraciones fisiológicas de los dinucleótidos liberados. En el caso de las células neurocromafines donde sus concentraciones pueden ser mas elevadas, los valores de Km están próximos o ligeramente por encima del 1 microMolar, mientras que en células de endotelios vasculares y en las del órgano eléctrico del pez torpedo, están por debajo del microMolar (Mateo et al. 1997a, 1997b). Los cationes divalentes pueden modificar las afinidades y las Vmax de estas enzimas y por sus efectos se puede deducir que hay al menos dos familias de ecto-diadenosina polifosfato hidrolasas. Una de ellas, la neural, es estimulada de modo muy similar por los iones Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ó Mn<sup>2+</sup>. Sin embargo las enzimas de endotelios vasculares son inhibidas por Ca<sup>2+</sup>, siendo el Mn<sup>2+</sup> un activador mucho más potente que el Mg<sup>2+</sup> (Miras-Portugal et al. 1997)

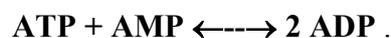
Es de esperar que en un próximo futuro se puedan clonar los diferentes enzimas de esta familia y determinar su analogía o diferencia con los de la familia de las ecto-fosfodiesterasas E-NPP.

### **9.5) Otras actividades ecto-nucleotídicas.**

Un enzima al que se ha prestado muy poca atención en el metabolismo extracelular de nucleótidos es la fosfatasa alcalina, que de hecho representa una familia de proteínas, ecto-fosfomonoesterasas, que tienen una amplia especificidad de sustrato (Rev. Zimmermann 2000). Son capaces de hidrolizar los nucleótidos trifosfato,

difosfato y monofosfato, hasta dejar solo el nucleósido y los fosfatos correspondientes. La amplia variedad de sustratos tiene sus consecuencias en la afinidad, que suele ser muy pobre por sus sustratos, y se encuentra en el rango mM. Al igual que la ecto-5'-nucleotidasa, la fosfatasa alcalina también se encuentra anclada a la membrana a través de un glicolípido el glicosilfosfatidilinositol, GPI, y por hidrólisis de ese anclaje el enzima se puede encontrar soluble en el suero. Sus acciones inespecíficas defosforilando proteínas de membrana y la relevancia de este efecto en la señalización y supervivencia celular ha sido poco estudiado. Un enzima con actividad similar a la de la fosfatasa alcalina, ha sido encontrada en el interior de las vesículas de secreción y liberada conjuntamente con su contenido. El enzima ha sido poco caracterizado todavía, pero permitiría que un enzima inactivo en el medio ácido vesicular, pudiera actuar sobre las sustancias nucleotídicas con las que ha sido co-almacenada, finalizando su acción señalizadora una vez en contacto con el medio externo (Todorov. Et al., 1997).

Otras actividades catalíticas descritas en la membrana plasmática son las que permiten la interconversión de nucleótidos. Este es el caso de la ecto-ATP:AMP fosfotransferasa, denominada también ecto-adenilato quinasa, o ecto-mioquinasa. La reacción es como sigue:



Esta actividad podría tener relevancia en cerebro en entornos específicos de receptores y se ha descrito por primera vez en sinaptosomas (Nagy et al. 1989).

La presencia de una ecto-nucleosido difosfoquinasa que puede interconvertir nucleósidos di y trifosfato, por ejemplo  $\text{ATP} + \text{UDP} \longleftrightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$ , ha sido descrita en astrocitos y en células de los epitelios de las vías respiratorias, en donde se encuentran los receptores P2Y<sub>2,4</sub> que tienen mayor afinidad por los nucleótidos pirimidínicos (Harden et al. 1997, Lazarowski et al. 1997).

La existencia de ecto-protein quinasas, que fosforilan proteínas por el lado extracelular y necesitan ATP como sustrato ha sido descrita y su relevancia reside en que algunas proteínas de gran importancia en la neurotransmisión, como los transportadores de la membrana plasmática de dopamina y de noradrenalina, podrían ser activados de este modo, mediante fosforilación extracelular (Ehrlich and Kornecki

1999).

### **9.6) Aspectos fisiopatológicos de las ecto-nucleotidasas.**

El análisis de la expresión de RNAm e inmunohistoquímica de los distintos tipos de ecto-nucleotidasas, indican que la mayoría de las células expresan enzimas de las distintas familias, e incluso más de un miembro de la misma familia de enzimas. Ejemplos de tejidos que co-expresan E-NTPDasas y E-NPPasas incluyen el cerebro, corazón, hígado, intestino delgado, músculo esquelético, ovario, páncreas, placenta, próstata, pulmones, testículo, etc., (Zimmermann 2000). En contraposición a este aparente desorden, existen notables diferencias en la distribución de los distintos miembros, o isoenzimas, de cada familia. Incluso existe la posibilidad de que miembros de una misma familia tengan localizaciones distintas dentro de la célula, sobre todo en células altamente polarizadas. Un caso bien conocido es el de los hepatocitos, en donde la ecto-fosfodiesterasa1, E-NPPasa1, está localizada exclusivamente en la membrana basolateral que da a la luz de los sinusoides hepáticos, mientras que la E-NPPasa3 está exclusivamente asociada con el canalículo biliar. Los mecanismos de biología celular que llevan a esta distribución tan específica no han sido todavía elucidados (Scott et al., 1997). Otros modelos ampliamente estudiados son los epitelios polarizados, como los nasales, bronquiales, o de origen intestinal. En todos ellos los datos experimentales apuntan a que la distribución de ecto-enzimas responsables del metabolismo de los diferentes nucleótidos, es asimétrica (Picher and Boucher 2000). En corazón, la presencia de la ecto-5'-nucleotidasa parece limitada a las células intersticiales, conocidas como pericitos, ó fibroblastos, pero no se ha podido detectar en los cardiomiocitos (Mlodzik et al. 1995). Estos datos sugieren que es necesario un cuidadoso estudio bioquímico para definir que enzimas participan en el metabolismo de nucleótidos, en un tejido concreto y en una célula específica. Solo de este modo se podrán interpretar correctamente las disfunciones que sus anomalías puedan originar.

Hay pocos ejemplos, por el momento, de cómo una alteración a nivel de las ecto-nucleotidasas puede modificar el funcionamiento tisular, no obstante nos referiremos a unos pocos que son suficientemente ilustrativos. En primer lugar en el proceso de la agregación plaquetaria, en el que la ecto-NTPDasa1 (CD39) juega un

papel muy relevante, pues facilita el paso de una sustancia proagregante plaquetaria, como es el ADP, a AMP, que dará al final adenosina, que es un vasodilatador y antiagregante de las plaquetas (Kaczmarek et al.1996). Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética, permiten obtener grandes cantidades de la E-NTPDasa1 en forma soluble y catalíticamente activa. La administración de este enzima por vía sistémica ha demostrado que puede reducir la formación de trombos y que permite la supervivencia de trasplantes en los cuales la cirugía lleva implícita un mayor riesgo de adherencia y agregación plaquetaria y por lo tanto de fallo del trasplante (Gayle et al. 1998). Las formas solubles de la NTPDasa1 desde esta perspectiva ofrecen un amplio potencial terapéutico. La relevante función de este enzima en la hemostasis y en la tromborregulación, ha sido corroborada por la generación de ratones deficientes en NTPDasa1 (cd39-/-), lo que confirma a su vez la importancia de la señalización mediada por nucleótidos en procesos de mantenimiento vascular (Enjyoji et al. 1999; Zimmermann, 1999).

Otro modelo que ha recibido mucha atención es el de las enfermedades o situaciones traumáticas que cursan con inflamación. Se sabe hoy día que la actividad y los niveles de proteína enzimática, ecto-ATPdifosfo hidrolasa (E-NTPdasa1), disminuyen en la superficie de las células de endotelios vasculares en zonas con procesos inflamatorios, y que esa disminución de la actividad, favorece que progrese la lesión vascular (Robson et al. 1997). La actividad de la ecto-ATPdifosfohidrolasa, es muy sensible al estrés oxidativo y su actividad se reduce considerablemente *in vivo* en las lesiones debidas a la reperfusión de órganos. Una situación similar ocurre en el trasplante de riñón, en donde la disminución de este enzima refleja la extensión de la lesión isquémica del tejido (Kaczmarek et al. 1996; van Son et al. 1997)

En la isquemia cerebral transitoria, se produce un incremento en la hidrólisis extracelular de ATP y como consecuencia se origina adenosina que es un poderoso vasodilatador y modulador de la función cerebral. En los días siguientes al episodio isquémico, se produce un incremento en la expresión de la E-NTPDasa1 (CD39) y de la ecto-5'-nucleotidasa en el modelo experimental de rata. Este incremento en la expresión está fundamentalmente asociado con la glia activa, principalmente microglia. De este modo cualquier salida en exceso de ATP, que al activar las células neurales a través de

los receptores ionotrópicos P2X puede resultar citotóxico, será contrarrestado por la rápida acción de las ecto-nucleotidasas que lo destruyen hasta adenosina (Braun et al. 1998).

El conocimiento que tenemos de las cascadas de ecto-nucleotidasas en diversas situaciones fisiopatológicas es todavía muy fragmentario e impreciso, pero contiene los elementos necesarios para dejar entrever la gran potencialidad de este campo. En el futuro la investigación tendrá que centrarse en las propiedades bioquímicas y estructurales de cada uno de los enzimas, su distribución por tejidos y el control de su expresión en el individuo adulto y durante el desarrollo. El conocimiento de las funciones fisiológicas relacionadas con cada tejido será el punto de partida para comprender las anomalías derivadas de sus disfunciones y se podrá intervenir tanto para incrementar su actividad, con enzimas obtenidas por ingeniería genética, como disminuir la actividad con inhibidores específicos, de los cuales se carece totalmente por el momento.

## 10).- Perspectivas futuras

*Por más lejos que mires, siempre habrá más allá el espacio sin límites,*

*Por más que cuentes, siempre habrá antes y después el tiempo sin límites.*

*Walt Whitman (Hojas de hierba)*

Ha pasado un cuarto de siglo desde que Burnstock (1976 a) propusiera que las terminales nerviosas podían liberar más de un transmisor y que ese transmisor era el ATP. Desde entonces el campo de la señalización extracelular por nucleótidos ha ido creciendo, con mucha controversia al principio, pero con una fuerza inusitada a partir de mediados de los años 90, del pasado siglo (1993-1994), en que se clonan los primeros miembros de las familias de receptores P2X y P2Y, y en que se relacionan las familias de ecto-nucleotidasas con proteínas conocidas como marcadores de diferenciación linfocitaria. No es de extrañar que a pesar de todo el avance del conocimiento en este área, el propio Burnstock señalara en un análisis de la situación en 1999, que *“El campo de la señalización por nucleótidos está todavía en su infancia y quedan por comprender todas las situaciones fisiológicas y patológicas en que sus receptores, enzimas de destrucción y maquinaria de liberación estén implicados. Algo que no se podrá realizar si antes no se desarrolla una farmacología específica para cada una de las etapas implicadas en la señalización”*.

En el reciente congreso que hemos organizado en Madrid (Julio 2000) *“Meeting Purines 2000 - Biochemical, Pharmacological and Clinical Perspectives”*, se ha podido constatar que este área ha avanzado en todos los frentes, desde los receptores y sus funciones fisiológicas, los enzimas de destrucción, el inicio de una farmacología específica, etc. Un extenso resumen general recogiendo esta información ha sido elaborado por el Dr. Pintor, el Dr. Fredholm del Karolinska Institutet y yo misma y aparece en *Trends in Pharmacological Sciences*, TIPS, de Diciembre de 2000 (Pintor et al. 2000). En dicho informe se pone de manifiesto cuales son los logros presentes y cuales son las ambiciones de los científicos del área.

Se espera un significativo avance en la comprensión de las funciones fisiológicas de los receptores P2X y P2Y, así como de las ecto-nucleotidasas, pues en

un futuro inmediato se dispondrá de animales con uno o varios genes bloqueados (knock-out sencillos, dobles o triples etc.). Este abordaje permitirá conocer la sintomatología de las disfunciones debidas a esas proteínas. Los problemas de coagulación asociados con el receptor P2Y<sub>1</sub> plaquetario y los efectos del receptor P2Y<sub>2</sub> en la secreción de fluidos en las vías respiratorias son una pequeña muestra que indica el desconocimiento de la patología asociada con las disfunciones de los receptores de esta familia. Del mismo modo los problemas de eyaculación, asociados a la subunidad P2X<sub>1</sub>; el control de la micción, o transmisión de las sensaciones periféricas, asociadas a la subunidad P2X<sub>3</sub>, son el comienzo de lo que pueden dar de sí las disfunciones asociadas a los receptores de la familia de receptores ionotrópicos. De esta familia P2X me gustaría recordar que ni siquiera sabemos el número de subunidades que se asocian para formar el canal regulado por ligando, ni como se mantienen los oligómeros asociados entre sí y con el citoesqueleto para conseguir una perfecta distribución en la topología celular.

Si bien se han hecho algunos avances en la farmacología de receptores y enzimas implicados en la señalización nucleotídica, estos son por el momento compuestos altamente cargados, que no atraviesan ninguna membrana biológica de modo significativo, por ello es aun remota la posibilidad de disponer de compuestos utilizables en farmacología clínica que vaya mas allá de los epitelios, de los endotelios tapizantes, o del torrente circulatorio.

Todavía se ignora mas del dialogo entre receptores en distintas células y de cómo estas liberan ATP de modo no exocitótico que actúa como una señal paracrina. El desconocimiento en un campo concreto de la ciencia, con tantas posibilidades en fisiología, patología y farmacología, no suele ser un inconveniente, si no un acicate que servirá, en mi opinión, para atraer a los jóvenes científicos, deseosos de explorar las fronteras del conocimiento.

Y permítanme que finalice aquí mi disertación, pues recordando a Baltasar Gracián: *“Algunos estiman los libros por su corpulencia, como si se escribiera para ejercitar los brazos más que el ingenio”*, no quisiera en este acto, obligarles abusando de su cortesía, a que ejercitaran su paciencia y no el disfrute del conocimiento de una

ciencia en plena expansión en donde queda casi todo el camino por recorrer.

He dicho.

Madrid 24 de Diciembre de 2000.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M.P. and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmac. Ther.*, 64: 445-475.
- Abraham, E. H., Prat, A. G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R. J., Kramer, R., Guidotti, G. and Cantiello, H. F. (1993). The multidrug resistance (*mdr1*) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 312-316.
- Apps, D. K. (1998). Chromaffin granule. H<sup>+</sup>-adenosinetriphosphatase –structure, kinetics and regulation by nucleotides. En: *The adrenal Chromaffin Cell*. Kanno, T., Nakazato, Y. y Kumakura, K. (eds), Hokkaido University Press, Sapporo. pg., 323-329.
- Bailey, S. J. and Hourani, S. M. O. (1995). Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Brit. J. Pharmacol.* **114**, 1125-1132.
- Baker, J.C., and Jacobson, M. (1986) Alteration of adenylyl dinucleotide metabolism by environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2350-2352.
- Bankston, L. A. and Guidotti, G. (1996) Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* **271**, 17132-17138.
- Bass, R. (1914) Über die Purinkörper des Menschlichen Blutes und den Wirkungsmodus der 2-Phenyl-4-Cholincarbonsäure (Atophan). *Arch. Exp.Pathol. Pharmacol.* **76**, 40.
- Baxi, M.D., and Vishwanatha, J.K. (1995) Uracil DNA-glycosylase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an Ap4A binding protein. *Biochemistry*, **34**: 9700-9707.
- Béjanin, S., Cervini, R., Mallet, J. and Berrard, S. (1994). A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J. Biol. Chem.* **269**, 21944-21947.
- Bellocchio, E.E.; Reimer, R.J.; Fremeau, R.T. and Edwards, R.H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, **289**, 957-960.
- Bennet, D.W. and Drury, A.N. (1931) Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. *J. Physiol.* **72**, 288-232.
- Berne, R.M. (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* **204**, 317-322.
- Blaschko, H., Born, G., D'Lorio, A., and Eade, N.R. (1956) Observations on the distribution of catecholamines and adenosine triphosphate in the bovine adrenal medulla. *J.Physiol. (Lond)*. **133**, 548-557.

Boarder, M.R., Weisman, G.A., Turner, J.T. and Wilkinson, G.F. (1995). G protein – coupled P2 purinoceptors: From molecular biology to functional responses. *TIPS*, **16**, 133-139.

Boettge, K., Jaeger, K.H. and Mittenzwei, H. (1957) Das Adenylsauresystem. *Arzneim. Forsch.* **7**, 24-59.

Boeynaems, J.M., Communi, D., Savi, P., and Herbert, J.M. (2000) P2Y receptors: in the middle of the road. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 1-3.

Bogdanov, Y. D., Dale, L., King, B. F., Whittock, N. and Burnstock, G. (1997). Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* **272**, 12583-12590.

Boyer, J. L., Lazarowski, E. R., Chen, X.-H. and Harden, T. K. (1993). Identification of a P<sub>2Y</sub>-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 1140-1146.

Boyer, J.L., Romero-Avila, T., Schachter, J.B., and Harden, T.K. (1996). Identification of competitive antagonists of the P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1323-1329

Boyer, J.L., Mohanram, A., Camaioni, E., Jacobson, K.A., and Harden, T.K., (1998). Competitive and selective antagonisms of P2Y1 receptors by N6-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *Br. J. Pharmacol* **124**, 1-3,

Boyer, J. L., Delaney, S.M., Villanueva, D., and Harden, T. K (2000). A molecularly identified P2Y receptor simultaneously activates phospholipase C and inhibits adenylyl cyclase and is nonselectively activated by all nucleoside triphosphates. *Mol. Pharmacol.* **57**, 805-810.

Brake, A. J., Wagenbach, M.J. and Julius, D., (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**, 519-523

Braun, N., Zhu, Y., Krieglstein, J., Culmsee, C., and Zimmermann, H., (1998). Upregulation of the enzyme chain hydrolysing extracellular ATP following transient forebrain ischemia in the rat. *J.Neurosci.* **18**, 4891-4900.

Burnstock, G. (1976a). Do some nerve cells release more than one transmitter?. *Neuroscience* **1**, 239-248.

Burnstock, G. (1976b). Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* **62**, 491-503.

Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. En: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Straub, R. W. y Bolis, L. (eds.), Raven Press, Nueva York. pp., 107-118.

Burnstock, G. (1982). The co-transmitter hypothesis, with special reference to the storage and release of ATP with noradrenaline and acetylcholine, in *Co-transmission* (Cuello, A. C., ed.), Macmillan, London, 151-163.

Burnstock, G. (1988). Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels. *TIPS* **9**, 116-117.

Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* **36**, 1127-1139.

Burnstock, G. (1998). Purinergic signalling: Therapeutic potential. *Drug Develop. Res.* **45**, 86-92.

Burnstock, G. (1999). Current status of purinergic signalling in the nervous system. *Progress in Brain Research.* **120**, 3-10

Burnstock, G. y Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptors?. *Gen. Pharmacol.* **16**, 433-440.

Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Brit. J. Pharmacol.* **40**, 668-688.

Burnstock, G., Dumsday, B. and Smythe, A. (1972). Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Brit. J. Pharmacol.* **44**, 451-461.

Camaioni, E., Boyer, J.L., Mohanram, A., Harden, T.K., and Jacobson, K.A, (1998). Deoxyadenosine-bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors. *J. Med. Chem.* **41**, 183-190

Carl, S. A. L., Smith, T. M. and Kirley, T. L. (1998). Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**, 463-470.

Casillas, T., Delicado, E. G., García-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T. (1993). Kinetic and allosteric cooperativity in L-adenosine transport in chromaffin cells. A mnemonical transporter. *Biochemistry* **32**, 14203-14209.

Castro, E., Mateo, J., Tomé, A.R., Barbosa, M., Miras-Portugal, M.T. and Rosario, L.M. (1995) Cell-specific purinergic receptors coupled to Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> release from internal stores in adrenal chromaffin cells: differential sensitivity to UTP and suramin. *J. Biol. Chem.*, **270**: 5098-5106.

Chadwick, B. P. and Frischauf, A. M. (1997). Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm. Genome* **8**, 668-672.

Chadwick, B. P. and Frischauf, A. M. (1998). The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **50**, 357-367.

Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R. and Tsolas, O. (1995). Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* **234**, 66-74.

Clair, T., Lee, H. Y., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. (1997). Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 996-1001.

Clarke, V.R.J. *et al.* (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, **389**: 599-602.

Cockayne D.A. *et al.* (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X<sub>3</sub>-deficient mice. *Nature*. **407**, 1011-1015.

Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. and Buell, G. (1996). Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* **16**, 2495-2507.

Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1997). Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 31969-31973.

Communi, D., Motte, S., Boeynaems, J. M. and Piroton, S. (1996). Pharmacological characterisation of the human P2Y<sub>4</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **317**, 383-389.

Communi, D., Robaye, B., M. and Boeynaems, J. M. (1999). Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 1199-1206.

Costa, E. (1998). From GABA<sub>A</sub> receptor diversity emerges a unified vision of GABAergic inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**: 321-350.

Cressman, V.L., Lazarowski, E., Homolya, L., Boucher, R.C., Koller, B. H., and Grubb, B.R. (1999). Effect of loss of P2Y<sub>2</sub> receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl<sup>-</sup> transport. *J. Biol. Chem.* **274**, 26461-26468

Dale, H. (1935) Pharmacology of nerve endings. *Proc. R. Soc. Med.* **28**, 319-322

Delicado, E.G., Casillas, T., Sen, R.P. and Miras-Portugal, M.T. (1994) Evidence that adenine nucleotides modulate the functionality of nucleoside transporter. Characterization of uridine transport in chromaffin cells and plasma membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.*, **225**: 355-362.

Delicado, E., Jiménez, A.I., Castro, E., and Miras-Portugal, M.T. (2000). Cerebellar astrocytes coexpress different purinoceptors: cross-talk between several transduction pathways. *Drug. Dev. Res.* **50**, 20.

Deuticke, H.J. (1932) Über den einfluss von adenosin und adenosinphosphorsäuren auf den isolierten Meerschweinuterus. *Pflüg. Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* **230**,

537-555.

Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (2000a). Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 434-440.

Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (2000b). Interactions between the cholinergic and the purinergic system. *Drug Develop. Resch.* **50**, 108.

Di Virgilio, F., (2000). Dr. Jekyll/Mr Hyde: The dual role of extracellular ATP. *J. Autonomic Nervous System.* **81**, 59-63.

Dowdall, M.J., Boyne, A.F., and Whittaker, V.P. (1974) Adenosine triphosphate: a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem.J.* **140**, 1-12.

Drury, A.N. (1936) The physiological activity of nucleic acid and its derivatives. *Physiol. Rev.* **16**, 292-325.

Drury, A.N. and Szent-Györgyi, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian subtypes. *J. Physiol. (Lond.)*. **68**, 213-237.

Dubyak, G. R. and El-Moatassim, C. (1993). Signal transduction via P<sub>2</sub>-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* **265**, C577-C606.

Edwards, F. A. and Gibb, A. J. (1993). ATP-a fast neurotransmitter. *FEBS Lett.* **325**, 86-89.

Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**, 144-147.

Ehrlich, Y.H., and Kornecki, E. (1999). Ecto-protein kinases as mediators for the action of secreted ATP in the brain. *Prog. Brain Res.* **120**, 411-426

Embden, C. and Zimmermann, G. (1927) Über die Bedeutung der Adenylsäure. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **167**, 137-140.

Enjyoji, K., Sévigny, J., Lin, Y., Frenette, P., Christie, P.D., Schulte am Esch, J., Imai, M., Edelberger, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D.M., Csizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C., and Rosenberg, R.D. (1999). Targeted disruption of *cd39*/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med.* **5**, 1010-1017.

Erb, L., Garrald, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T. and Weisman, G. A. (1995). Site-directed mutagenesis of P<sub>2U</sub> purinoceptors. Positively charged aminoacids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 4185-4188.

Evans, R. J., Lewis, C., Virginio, C., Lundstrom, K., Buell, G., Surprenant, A. and

North, R. A. (1996). Ionic permeability of , and divalent cations effect on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol. (Lond.)* **497**, 413-422.

Evans, R. J., Surprenant, A. and North, R. A. (1998). P2X receptors. Cloned and expressed. En: *The P2 nucleotide receptors*. Turner, J. T., Weisman, G. A. y Fedan, J. S. (eds.), Humana Press Inc., Totowa. pg., 43-61.

Fiske, C. H. and Subbarow, Y.(1929) Phosphorous compounds of muscle and liver, *Science* **70**, 381-382.

Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *J. Biol. Chem.* **274**, 12951-12954.

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P. and Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-156.

Fredholm, B. B., Burnstock, G., Harden, T.K., and Spedding, M. (1996) Receptor Nomenclature. *Drug. Dev. Res.*, **39**, 461-466

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Dubyak, G.R., Harden, T.K., Jacobson, K. A., Schwabe, U., and Williams, M. (1997).Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors, *Trends Pharmacol. Sci. TIPS.*, **18**, 79-82

Fredholm, B.B.; Bättig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A. and Zvartau, E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **51**, 84-133.

Freund, H. (1920) Uber die pharmakologischen Wirkungen des defibrinierten Blutes. *Arch. Expt. Pathol. Pharmacol.* **86**. 267.

Garcia-Guzmán, M., Soto, F., Laube, B., and Stühmer, W. (1996). Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P<sub>2X</sub> purinoceptor. *FEBS Lett.* **388**, 123-127.

Garcia-Guzmán, M., Stühmer, W., and Soto, F., (1997). Molecular cloning and pharmacological properties of the human P2X<sub>3</sub> purinoceptor. *Mol. Brain Res.* **47**, 59-66.

Gasmi, L., Cartwright, J. L. and McLennan, A. G. (1998). The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochim. Biophys. Acta* **1405**, 121-127.

Gayle, R.B., Maliszewski, C.R., Gimpel, S.D., Schoenborn, M.A., Caspary, R.G., Richards, C., Brasel, K., Price, V., Drosopoulos, J:H:F., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Broekman, M.J., and Marcus, A.J. (1998). Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* **101**, 1851-1859.

Gerlach, E., Deuticke, B., and Orgisback, R.H. (1963) Der nucleotid-abbau im hertzmuskel bei sauerstoffmanger und seine möglicheee bedeutung für die coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* **50**, 228-229

Giraldez, L., Diaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Pintor, J., Castro, E. and Miras-Portugal M.T. (2001). ATP and diadenosine polyphosphate receptors in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* (in press)

Goding, J. W., Terkeltaub, R., Maurice, M., Deterre, P., Sali, A. and Belli, S. (1998). Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol. Rev.* **161**, 11-26.

Goldman, S. J., Gordon, E. L. and Slakey, L. L. (1986). Hydrolysis of diadenosine 5',5''-P',P''-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) by porcine aortic endothelial cells. *Circ. Res.* **59**, 362-366.

Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J.; Miras-Portugal, M.T. and Pintor, J. (2000). Adenosine 5'-tetrphosphate (Ap<sub>4</sub>), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology*, **39**, 2381-2390.

Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J.; and Miras-Portugal, M.T., (2001). Single GABAergic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* (in press)

Gordon, J. L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* **233**, 309-319.

Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schenlein, P. V., Germann, U. A. and Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 607-649.

Green, H.N. and Stoner, H.B. (1950) The effect of purine derivatives on the cardiovascular system, in *Biological Actions of the Adenine Nucleotides*. H.K. Lewis, London, pp.65-103.

Gu, J.G. and Macdermott, A.B. (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*, **389**: 749-753.

Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., García-Carmona, F. and Miras-Portugal, M.T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for mnemonic regulation. *J.Biol. Chem.*, **271**: 1957-1965.

Gualix, J., Fideu, M.D., Pintor, J., Rotllán, P., García-Carmona, F. and Miras-Portugal, M.T. (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules frm adrenal medulla. *FASEB*, **11**: 981-990.

Gualix, J., Alvarez, A.M., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (1999a) Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent e-ATP and granular size increase induced by ATP. *Receptors and Channels*, **6**, 449-461.

- Gualix, J., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (1999b) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **73**, 1098-1104.
- Harden, T.K., Boyer, J.L., and Nicholas, R.A. (1995). P2-purinergic receptors: subtype-associated signalling responses and structure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 541-549.
- Harden, T.K., Lazarowski, E.R., and Boucher, R.C. (1997). Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci.* **18**, 43-46
- Henry, J.-P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M.-F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J. and Gasnier, B. (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J. Exp. Biol.* **196**, 251-262.
- Henry, J.-P., Sagné, C., Bedet, C. and Gasnier, B. (1998). The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem. Int.* **32**, 227-246.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1992) Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic glutamate receptor stimulation. *Nature*, 360:
- Hillarp, N.A., Hogberg, B., and Nilson, B. (1955) Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow. *Nature* **176**, 1032-1033.
- Holmsen, H., and Weiss, H.J. (1979). Secretable storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* **30**, 119-134.
- Holton, P. (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.*, **145**, 494-504.
- Holton, F. A. and Holton, P. (1953). The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* **119**, 50P-51P.
- Holton, F.A. and Holton, p. (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)*. **126**, 124-140.
- Hourani, S.M.O. and Cusack, N.J. (1991) Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol. Rev.* **43**, 243-298
- Hoyle, C. H. V., Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (1997). Antagonism of P2X receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate. *Eur. J. Pharmacol.* **333**, R1-R2.
- Hucho, F., Tsetlin, V.I., and Machold, J. (1996) The emerging three dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* **239**, 539-557.

Jacobson, K. A., et al (1999). Molecular recognition in P2 receptors: ligand development aided by molecular modeling and mutagenesis. *Prog. Brain Resc* **120**, 119-132.

Janssens, R., Paindavoine, P., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (1999). Human P2Y<sub>2</sub> receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 709-716.

Jiang, Q., Guo, D., Lee, B. X., van Rhee, A. M., Kim, Y. C., Nicholas, R., Schachter, J., Harden, T. K. and Jacobson, K. A. (1997). Mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* **52**, 499-507.

Jiménez, A. I., Castro, E., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1998). Potentiation of adenosine 5'-triphosphate calcium responses by diadenosine pentaphosphate in individual rat cerebellar astrocytes. *Neurosci. Lett.* **246**, 109-111.

Jiménez, A. I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1999). Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptors stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type I cerebellar astrocytes. *Glia*, **26**, 119-128.

Jiménez, A. I., Castro, E., Communi, D., Boeynaems, J.M., Delicado, E. G. y Miras-Portugal, M. T. (2000). Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* **75**, 2071-2079.

Jin-Hua, P., Goding, J. W., Nakamura, H. and Sano, K. (1997). Molecular cloning and chromosomal localization of PD-I $\beta$  (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes. *Genomics* **45**, 412-415.

Jovanovic, A. and Terzic, A. (1996) Diadenosine tetraphosphate-induced inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in patches excised from ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 233-235.

Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J., Beaudoin, A. R., Bach, F. H. and Robson, S. C. (1996). Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**, 33116-33112.

Khakh, B.S., Humphrey, P.P.A. and Surprenant, A. (1995). Electrophysiological properties of P2X purinoceptors in rat superior cervical, nodose and guinea-pig coeliac neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **484**. 385-395

Khakh, B.S., and Henderson, G. (2000) Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J. Auton. Nerv. Sys.* **81**, 110-121.

Khakh, B.S., Zhou, X., Sydes, J., Galligan, J.J. and Lester, H.A. (2000). State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature*, **406**, 405-410.

King, B. F., Liu, M., Pintor, J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. and Burnstock, G. (1999). Diinosine pentaphosphate (Ip<sub>5</sub>I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub>

- receptors. *Brit. J. Pharmacol.* **128**, 981-988.
- Knöfel, T. and Sträter, N. (1999). X-ray structure of the *Escherichia coli* periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 448-453
- Kunapuli, S.P.; Daniel, J.L. (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* **336**, 513-523.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G. and Mutschler, E. (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* **217**, 217-219.
- Lazarowski, E., Watt, W., Stutts, M.J., Boucher, R. and Harden, T.K. (1995) Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 1619-1627.
- Lazarowski, E.R.; Homolya, L.; Boucher, R.C., and Harden, T. K. (1997). Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J. Biol. Chem.* **272**, 20402-20407.
- Lê, K. T., Babinski, K. and Seguela, P. (1998). Central P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>6</sub> channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci.* **18**, 7152-7159.
- Lê, K.-T., Boué-Grabot, E., Archambault, V. and Séguéla, P. (1999). Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> subunits. *J. Biol. Chem.* **274**, 15415-15419.
- Lee, J. W., Jeon, S. J., Kong, I. D. and Jeong, S. W. (1995a). Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Kor. J. Physiol.* **29**, 217-223.
- Lee, J. W., Kong, I. D., Park, K. S and Jeong, S. W. (1995b). Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei Med. J.* **36**, 487-496.
- Lienhardt, G.E. and Secemsky, I.I. (1973) P<sub>1</sub>,P<sub>5</sub>-Di(adenosine-5')-pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **248**: 1121-1123.
- Leon, C., Vial, C., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (1996). Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y<sub>1</sub> purinoceptor. *Gene*, **171**, 295-297.
- Leon, C., Hechler, B., Vial, C., Leray, C., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (1997). The P2Y<sub>1</sub> receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.*, **403**, 26-30.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlman, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increase resistance to thrombosis in purinergic P2Y<sub>1</sub> receptor-null mice. *J. Clin. Invest.*

**104**, 1731-1737.

Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, 432-435.

Li, C. H., Ramjeesingh, M. and Bear, C. E. (1996). Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 11623-11626.

Lippman, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Enzymology* **1**, 99

Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Privé, G.G., Eisenberg, D., Brecha, N. and Edwards, R.H. (1992). A cDNA that suppresses MPP<sup>+</sup> toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**, 539-551.

Loewi, O. (1949) On the antagonism between pressor and depressor agents in the frog's heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, 295-304.

Lohmann, K. (1929) Über die pyrophosphatfraktion im muskel. *Naturwissenschaften* **17**, 624-625.

Luqmani, Y.A. (1981) Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience*. **6**, 1011-1021.

Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J. and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 5113-5117.

Lüthje, J., and Ogilvie, A. (1983) The presence of diadenosine 5'.5'''-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**: 253-260.

Maliszewski, C. R., DeLepesse, G. J. T., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S. D. and Gayle, R. B. (1994). The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* **153**, 3574-3583.

Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **51**, 439-464.

Mateo, J., Harden, T. K. and Boyer, J. L. (1999). Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Brit. J. Pharmacol.* **128**, 396-402

Mateo, J., Miras-Portugal, M.T. and Castro, E. (1996) Co-existence of P2Y- and PPADS-insensitive P2U-purinoreceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 1223-1232.

Mateo, J., Miras-Portugal, M.T. and Rotllán, P. (1997a) Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **273**: C918-C927.

Mateo, J., Rotllán, P., Marti, E., Gómez de Aranda, I., Solsona, C. and Miras-Portugal, M.T. (1997b) Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of *Torpedo* electric organ. *Biochem. J.*, **323**: 677-684.

Mateo, J., Martínez de Lecea, M., Miras-Portugal, M.T. and Castro, E. (1998) Ca<sup>2+</sup> signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, **18**: 1704-1712.

McLennan, A.G. (1992) Ap4A and other dinucleoside polyphosphates, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Miras-Portugal, M.T., Castro, E., Mateo, J., and Pintor, J., (1996) The diadenosine polyphosphate receptors: P2D purinoceptors, in *P2 Purinoceptors: Localization, Function and transduction mechanisms*, Ciba Foundation Symposium **198**. John Wiley, London, 35-47

Miras-Portugal, M.T., Díaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J., Castro, E. and Pintor, J. (2000) Presynaptic signalling mediated by mono-and dinucleotides in the central nervous system. *J. Autonomic. Nervous System* **81**, 195-199.

Miras-Portugal, M.T., Gualix, J. and Pintor, J. (1998) The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. (Rev). *FEBS Lett.* **430**, 78-82

Miras-Portugal, M.T., Gualix, J., Mateo, J., Díaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Castro, E. and Pintor, J. (1999), *Progress in Brain Research*, **120**, 397-409

Miras-Portugal, M. T., Rotllán, P. and Mateo, J. (1997). Ecto-nucleotidases. Studies on the diadenosine polyphosphate hydrolases from neural and endothelial origin. En: *Neurochemistry. Teelken y Korf (eds.)*, Plenum Press, Nueva York. pg., 695-700.

Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S. and Ikehara, Y. (1990a). Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *J. Biol. Chem.* **265**, 2178-2183.

Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S. and Ikehara, Y. (1990b). Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur. J. Biochem.* **191**, 563-569

Mlodzik, K., Loffing, J., Lahir, M., and Kaissling, B. (1995) Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart. *Histochem. Cell Biol.* **103**, 227-236.

Moriyama, Y. and Nelson, N. (1987) The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *J. Biol. Chem.* **262**, 9175-9180.

Moro, S., Guo, D., Camaioni, E., Boyer, J. L., Harden, T. K. and Jacobson, K. A. (1998). Human P2Y<sub>1</sub> receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J. Med. Chem.* **41**, 1456-1466.

Motte, S., Piroton, S. y Boeynaems, J. M. (1993). Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells: Involvement of P2Y and P2U receptors in inositol phosphate response. *Circ. Res.* **172**, 504-510.

Mulryan, K., Gitterman, D.P., Lewis, C.J., Vial, C., Leckie, B.J., Cobb, A.L., Brown, J.E., Conley, E.C., Buell, G., Pritchard, C.A., and Evans, R.J. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X<sub>1</sub> receptors. *Nature.* **403**, 86-89.

Mulero, J. J., Yeung, G., Nelken, S. T. and Ford, J. (1999). CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Biol. Chem.* **274**, 20064-20067.

Murata, J., Lee, H.J., Clair, T., Krutzsch H.C., Arestad, A.A., Sobel, M.E., Liotta, L.A., and Stracke, M.L. (1994). CDNA cloning of the human motility-stimulating protein autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J.Biol. Chem.* **269**, 30479-30484.

Nagy, A.K., Shuster, T.A., and Delgado-Escueta, V. (1989). Rat brain synaptosomal ATP:AMP-phosphotransferase activity. *J. Neurochem.* **53**, 1166-1172

Narita, M., Goji, J., Nakamura, H. and Sano, K. (1994). Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-1 $\alpha$ ) from rat brain. *J. Biol. Chem.* **269**, 28235-28242.

Neary, J.T., McCarthy, M., Cornell-Bell, A., and Kang, Y. (1999). Trophic signalling pathways activated by purinergic receptors in rat and human astroglia. *Prog. Brain Res.* **120**, 323-332

Nicholas, R.A., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Li, Q., and Harden, K. (1996). Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* **50**, 224-229.

Nicke, A., Bäumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998). P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**, 3016-3028.

Nicke, A., Rettinger, J., Büttner, C., Eichele, A., Lambrecht, G., and Schmalzing, G. (1999). Evolving view of quaternary structures of ligand-gated ion channels. *Prog. Brain Res.* **120**, 61-80.

Nörenberg, W., and Illes, P. (2000). Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**. 324-339.

- North, R. A. (1996). Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**, 474-483.
- North, R. A., and Barnard, E., (1997). Nucleotide receptors. *Curr. Op. Neurobiol.* **7**, 346-357.
- North, A.R., and Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 563-80.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A., Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 137-141.
- Ogilvie, A. (1992). Extracellular functions for Ap<sub>n</sub>A. En: *Ap<sub>4</sub>A and other dinucleoside polyphosphates*. McLennan, A. G. (ed.), CRC Press, Boca Raton. pg., 229-273.
- Ogilvie, A., Lüthje, J., Pohl, U. and Busse, R. (1989). Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochem. J.* **259**, 97-103.
- Pankratov, Y. Castro, E., Miras-Portugal, M.T., and Krishtal, O., (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3898-3902.
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A.; and Casado, F.J. (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol. Sci TIPS.* **19**. 424-430
- Picher, M. and Boucher, R.C. (2000). The role of alkaline phosphatase and Ecto-nucleotidase in adenosine production on human airway epithelia. *Drug. Dev. Res.* **50**, 24.
- 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, P2Y<sub>ApnA</sub>, P4 and dinucleotide receptors: are there too many? *TIPS*, **21**, 135.
- Pintor, J., Torres, M. and Miras-Portugal, M.T. (1991a) Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates -Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A- from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci.*, **48**: 2317-2324.
- Pintor, J., Torres, M., Castro, E., and Miras-Portugal, M.T. (1991b) Characterization of diadenosine tetraphosphate Ap<sub>4</sub>A binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P2Y site. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1980-1984.
- Pintor, J., Diaz-Rey, M.A., Torres M. and Miras-Portugal, M.T. (1992a) Presence of diadenosine polyphosphates -Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A- in rat brain synaptic terminals. Ca<sup>2+</sup>

dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci.Lett.*, 136: 114-144.

Pintor, J., Kowalewsky, H.J., Torres, M., Miras-Portugal, M.T. and Zimmermann, H. (1992b) Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ. *Neurosci. Res. Commun.*, 10: 9-15.

Pintor, J., Rotllán, P., Torres, M., and Miras-Portugal, M.T. (1992c). Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal. Biochem.* **200**, 296-300

Pintor, J., Díaz-Rey, M.A. and Miras-Portugal, M.T. (1993) Ap<sub>4</sub>A and ADP-β-S binding to P<sub>2</sub>-purinergic receptors present on rat brain synaptic terminals. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 1094-1099.

Pintor, J., Porras, A., Mora, F. and Miras-Portugal, M.T. (1995) Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates – Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A- from neostriatum of the conscious rat. *J. Neurochem.*, 64: 670-676.

Pintor, J., King, B.F., Miras-Portugal, M.T. and Burnstock, G. (1996) Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> and P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.*, 119: 1-7.

Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M.T. (1997a) Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor. *Mol. Pharmacol.*, 51: 277-284.

Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M.T. (1997b) Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (protein kinases A and C) and protein phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem.*, 68: 2552-2557.

Pintor, J., Puche, J.A., Gualix, J. Hoyle, C.H.V. and Miras-Portugal, M.T. (1997c) Diadenosine polyphosphates evoke Ca<sup>2+</sup> transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP. *J. Physiol.*, 504: 327-335.

Pintor, J., Miras-Portugal, M.T., and Fredholm B. B. (2000). Research on purines and their receptors comes of age. *TIPS*, December

Pivorum, E.B. and Nordone, A. (1996) Brain synaptosomes display a diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A)-mediated Ca<sup>2+</sup> influx distinct from ATP-mediated influx. *J. Neurosci. Res.*, **44**: 478-489.

Radford, K.M., Virginio, C., Surprenant, A. North, R. A, and Kawashima, E. (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> and P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> receptors. *J. Neurosci.* **17**, 6529-6533.

Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492.

Ramos, A., Pintor, J., Miras-Portugal M.T. and Rotllan, P. (1995) Use of fluorogenic substrates for detection and investigation of ectoenzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates: a fluorometric study on chromaffin cells. *Anal. Biochem.* **228**: 74-82.

Rapaport, E. and Zamecnik, P. C. (1976). Presence of diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate (Ap<sub>4</sub>A) in mamalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3984-3988.

Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A. and Cantiello, H. F. (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 20484-20591.

Resta, R., Hooker, S. W., Hansen, K. R., Laurent, A. B., Park, J. L., Blackburn, M. R., Knudsen, T. B. and Thompson, L. F. (1993). Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* **133**, 171-177.

Ricard, J. and Cornish-Bowden, A. (1987). Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur. J. Biochem.* **166**, 255-272.

Ricard J., Buc, J., and Meunier, J.-C. (1977). Enzyme memory. 1. A transient kinetic study of wheat-germ hexokinase L1. *Eur. J. Biochem.* **80**, 581-592.

Richardson, P. J. and Brown, S. J. (1987). ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* **48**, 622-630.

Ripoll, C., Martín, F., Rovira, J.M., Pintor, J., Miras-Portugal, M.T. and Soria, B. (1996) Diadenosine polyphosphates: a novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetes*, **45**: 1431-1434.

Robson, S.C., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Candinas, D., Koziak, K., Millan, M., Hancock, W.W., and Bach, F.H. (1997). Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J.Exp. Med.* **185**, 153-163

Rodríguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E.G. and Miras-Portugal, M.T. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates -Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A- in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J. Neurochem.*, **51**: 1699-1703.

Rodríguez-Pascual, F., Torres, M. and Miras-Portugal, M.T. (1992a) Studies on the turnover of ecto-nucleotidases and ecto-dinucleoside polyphosphate hydrolase in cultured chromaffin cells. *Neurosci. Res. Commun.*, **11**: 101-107.

Rodríguez-Pascual, F., Torres, M., Rotllán, P. and Miras-Portugal, M.T. (1992b) Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, Ap<sub>n</sub>A, by bovine chromaffin cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**: 176-183.

Rodríguez-Pascual, F., Cortés, R., Torres, M., Palacios, J.M. and Miras-Portugal, M.T. (1997) Distribution of [3H]-Ap<sub>4</sub>A binding sites in rat brain. *Neurosci.*, **77**: 247-255.

- Rotllán, P. and Miras-Portugal, M. T. (1985). Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur J. Biochem.* **151**, 365-371.
- Sagné, C., El-Mestikawy, S., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J-P., Giros, B. and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* **417**, 177-183.
- Schachter, J.B., Boyer, J.L., Li, Q., Nicholas, R.A., and Harden, T.K. (1997). Fidelity in functional coupling of the rat P2Y<sub>1</sub> receptor to phospholipase C. *Br. J. pharmacol.* **122**, 1021-1024.
- Schlüter, H., Offers, E., Brüggemann, G., van der Giet, M., Tepel, M., Nordhoff, E., Karas, M., Spieker, C., Witzel, H. y Zidek, W. (1994). Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* **367**, 186-188.
- Schwiebert, E. M. (1999). ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am. J. Physiol.* **45**, C1-C8.
- Scott, J. (1999). Good cholesterol news. *Nature* **400**, 816-818.
- Scott, L. J., DeLautier, D., Meerson, N. R., Trugnan, G., Goding, J. W. and Maurice, M. (1997). Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral plasma membrane surfaces of rat hepatocytes. *Hepatology* **25**, 995-1002.
- Sen, R.P., Delicado, E.G., and Miras-Portugal, M.T. (1999). Differential modulation of nucleoside transport types in neuroblastoma cells by protein kinase action. *Neuropharmacology.* **38**, 1009-1015.
- Silinsky, E. M. (1975). On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* **247**, 145-162.
- Smith, T. M. and Kirley, T. L. (1998). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 65-78.
- Smith, T. M. and Kirley, T. L. (1999). Glycosilation is essential functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry* **38**, 321-328.
- Somers, G. R., Hammet, F. Woollatt, E., Richards, R.I. Southey, M.C. and Venter, D.J. (1997). Chromosomal localization of the human P2Y<sub>6</sub> purinoceptor gene and phylogenetic analysis of the P2Y purinoceptor family. *Genomics.* **44**, 127-130.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C. and Stühmer, W. (1996). Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **223**, 456-460.

Soto, F., Garcia-Guzman, M. and Stühmer, W. (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membrane Biol.* **160**, 91-100.

Souslova et al., (2000). Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X<sub>3</sub> receptors. *Nature*, **407**, 1015-1019.

Spychala, J., Zimmermann, A.G. and Mitchell, B.S., (1999). Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter –role of the cAMP response element site in mediating repression by the up-stream regulatory region. *J. Biol. Chem.* **274**, 22705-22712.

Stein, W.D. (1997). Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal. *Physiol. Rev.* **77**, 545-590.

Stout, J. G. and Kirley, T. L. (1996). Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular crosslinking modulates ATPase activity. *Biochemistry* **35**, 8289-8298.

Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E. and Liotta, L. A. (1992). Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 2524-2529.

Surprenant, A., Buell, G. and North, R. A. (1995). P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci.* **18**, 224-229.

Suzuki, K., Furukawa, Y., Tamura, H., Ejiri, N., Suematsu, H., Taguchi, R., Nakamura, S., Suzuki, Y. and Ikezawa, H. (1993). Purification and cDNA cloning of bovine liver 5'-nucleotidase, a GPI-anchored protein, and its expression in COS cells. *J. Biochem.-Tokyo* **113**, 607-613.

Takamori, S., Rhee, J.S., Rosemund, C., and Jahn R. (2000) Identificación of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-193.

Todorov, L. D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T. D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R. A. and Westfall, D. P. (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* **387**, 76-79.

Torres, G. E., Egan T. M. and Voigt, M. M. (1998). Topological analysis of the ATP-gated ionotropic P2X<sub>2</sub> receptor subunit. *FEBS Letters.*, **425**, 19-23

Torres, G. E., Egan T. M. and Voigt, M. M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **274**, 6653-6659.

Torres, M., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (1990). Presence of ectonucleotidases in cultured chromaffin cells: hydrolysis of extracellular adenine nucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 37-44.

Valera, s., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, r.A., Surprenant, a. and Buell, G.

(1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, **371**, 516-519.

van Driel, I. R. and Goding, J. W. (1987). Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. Primary structure deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* **262**, 4882-4887.

van Son, W.J., Wit, F., Balem, O.L.B. van, Tegzess, A.M., Ploeg, R.J., and Bakker, W.W. (1997). Decreased expression of glomerular ecto-ATPase in kidney grafts with delayed graft function. *Transplant Proc.* **29**, 352-354.

Volkandt, W., Vogel, M., Pevsner, J., Misumi, Y., Ikehara, Y. and Zimmermann H. (1991). 5'-nucleotidase from the electric ray electric lobe. Primary structure and relation to mammalian and procaryotic enzymes. *Eur. J. Biochem.* **202**, 855-861

von Kügelgen, I., and Wetter, A., (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 310-323.

Walker, J., Lewis, T. E., Pivorun, E. P. y Hilderman, R. H. (1993). Activation of the mouse heart adenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>-P<sub>4</sub>-tetrphosphate receptor. *Biochemistry* **32**, 1264-1269.

Wang, T. F. and Guidotti, G. (1996). CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9898-9901

Wang, T. F. and Guidotti, G. (1998). Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **273**, 11392-11399.

Wang, T. F., Ou, Y. and Guidotti, G. (1998). The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.*

Watts, D.T. (1953) Stimulation of uterine muscle by adenosine triphosphate. *Am. J. Physiol.* **173**, 291-296.

Webb, T., and Barnard, E. (1999). Molecular biology of P2Y receptors expressed in the nervous system. *Progress in Brain Research*, **120**, 23-31.

Webb, T. E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B. F., Burnstock, G. and Barnard, E. A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein coupled ATP receptor. *FEBS Letters.*, **324**, 219-225.

Weber, A., and Winkler, H. (1981) Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **6**, 2269-2276.

Wedd, A. M. and Drury, A. N. (1934) The action of certain nuclei acid derivatives on the coronary flow in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **50**, 157-164.

Wildman, S. S., Brown, S. G., King, B. F. and Burnstock, G. (1999). Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptors subunits. *Eur. J. Pharmacol.* **367**,

119-123.

Winkler, H. and Carmichael, S.W. (1982). The chromaffin granule. *The secretory granule. Poisner, A.M. and Trifaró, J.M., Elsevier Biomedical Press, N.Y.* 3-78.

Wonnacott, S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *TINS*, 20: 92-98.

Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. and Shimizu, T. (1997). A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature* **387**, 620-624.

Zimmermann, H. (1978) Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the *Torpedo* electric organ. *Neuroscience* **3**, 827-836.

Zimmermann, H. (1992). 5'Nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285**, 345-365.

Zimmermann, H. (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *TINS* **17**, 420-426.

Zimmermann, H. (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Develop. Res.*, **39**: 337-352.

Zimmermann, H. (1999). Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 231-236.

Zimmermann, (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 299-309.

Zimmermann, H. and Denston, C. R. (1976). Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Brain Res.* **111**, 365-376.

**CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO  
EN LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA**

**de la Excma. Sra. Dña. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal**

**POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO**

**Excmo. Sr. D. Angel Santos Ruiz**

## DISCURSO DE CONTESTACIÓN

Excmo. Sr. Director,  
Excmas. y Excmos. Señoras y Señores Académicos,  
Señoras y señores,

Como miembro de esta Real Academia de Farmacia del Instituto de España me cabe hoy, y ahora, el privilegiado encargo que representa la contestación al discurso de ingreso como académica de número, en tan docta corporación, de la Doctora María Teresa Miras Portugal, cumpla misión que *sub specie amoris*, es decir enfocada preferentemente con la óptica del afecto, dado que la extraordinaria personalidad de la interesada es bien conocida en sus rasgos generales, e incluso particulares. No obstante, no creo que importe, y además es protocolario reiterar alguna información tanto más cuanto que, como en este caso, supone un aleccionador ejemplo de verdad.

Respecto a la verdad, cinco son las virtudes que Bertold Brecht atribuía a los correctos narradores: valor para exponerla; sagacidad para conocerla; arte para expresarla; juicio para darle eficacia; astucia para propagarla: Y éstas me agradecería poseer para llevar galana y adecuadamente a fin mi tarea en este momento. A tal propósito no me parece que esté de más recordar que la ciencia desde tiempo de los árabes ha tenido dos principales funciones: capacitarnos para conocer; capacitarnos para hacer. Los helenos se interesaron sólo por la primera, quizá con la excepción de Arquímedes; su instinto les aconsejaba ganar el equilibrio necesario para caminar entre los abismos: la *sophrosyne*. Pues bien, M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal no ha seguido la tradición griega y, en consecuencia, se ha capacitado para conocer y para hacer, lejos de la medianía, de los denominados mesotes de la ética helénica.

### I

María Teresa Miras Portugal nació el 20 de febrero de 1948 en Carballino, ahora Carballiño, precioso lugar en la provincia de Orense, con un parque, que bordea el río Arenteiro, notable por su extensión, por la variedad de especies de sus arboles y también por el balneario de aguas sulfurosas, que pertenece a la familia de Doña Emilia Pardo Bazán, que ambientó allí su novela “El cisne de Vilamorta” y donde residió

alguna temporada.

María Teresa Miras realizó sus tempranos estudios en el colegio de la Divina Pastora de las Madres Franciscanas de su pueblo natal, hasta cuarto de bachiller y reválida. El Bachillerato superior, 5º, 6º y Preuniversitario los llevó a cabo en Santiago de Compostela en el colegio de la Enseñanza, distinguido por su exigencia y regido por las Madres de la Compañía de María, congregación fundada por Juana de Lestonnac, sobrina de Montaigne. Escogió el bachillerato de ciencias, aunque la historia y la literatura siguen siendo una de sus más gratas aficiones. Los estudios universitarios los desarrolló en dos etapas. La primera en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela; todavía recuerda su entrada por el portalón labrado del imponente palacio de Fonseca, su claustro gris, las azaleas de color rosa en primavera y las oxalis de la misma coloración en casi todas las épocas del año. Recién llegada a la Facultad obtuvo el puesto de alumna interna para la asignatura de Química Inorgánica, a cargo de Jaime González Carreró. Experiencia que marcaría su futura vocación en enseñar el rigor y la meticulosidad que se necesitan para sacar buenos datos y lo valioso que resulta suplir la escasez con imaginación.

La segunda etapa corresponde a la Facultad de Farmacia de Madrid en el curso 1968-1969. Entró entonces en contacto con la bioquímica y sus enseñanzas, que al parecer, actuaron de modo decisivo en su ulterior elección. Finalizó la carrera de Farmacia con Premio Extraordinario de Licenciatura y Premio Nacional fin de Carrera, y fue admitida en el Departamento de Bioquímica del que yo era Director en Septiembre de 1970. Comenzó así su labor docente e investigadora. Por seguir a su esposo, tuvo que interrumpir la tesis doctoral sobre la glutamina sintetasa, dirigida por Pilar Gonzalez, y en 1971 pasó en Estrasburgo al laboratorio de Paul Mandel en el Centro de Neuroquímica. Permaneció allí cuatro años, con tres becas, una del Ministerio de Asuntos Exteriores francés, otra del Ministerio español de Educación, y una tercera de la Fundación Juan March. El Centro de Neuroquímica era por entonces lugar de encuentro de científicos americanos y europeos, donde se efectuaban estancias de sabático y donde podían escucharse conferencias de muchos que serían con el tiempo Premios Nobel, como Julius Axelrod, Rita Levi-Montalcini, Palade, Neher, Kandel, Greengard y otros. Su parcela de trabajo en aquellos tiempos fue el enzima de síntesis

de las catecolaminas, la dopamina-beta-hidroxilasa; justamente la que sintetiza noradrenalina a partir de dopamina. Conjuntamente con Dominique Aunis consiguió una serie de hallazgos que culminaron en una tesis doctoral, la cual fue aceptada con la máxima calificación de *Trés Honorable* y felicitaciones del Jurado.

A su vuelta a España en 1975, fue de nuevo acogida en los laboratorios de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid, donde se incorporó a la docencia y la investigación. Posteriormente en 1978 consiguió una plaza de Profesor adjunto numerario de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid que dirigía Alberto Sols. Abordó allí, en su laboratorio, el interés por los niveles de nucleótidos en tejidos neurales y por las vías de recuperación de las bases libres y de los nucleósidos. En 1981 obtuvo por oposición la plaza de Profesor agregado de la Universidad de Oviedo y en 1982 la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia. Las tierras murcianas y el Mediterráneo fueron un descubrimiento: la luz, el aroma de los azahares, la gente...Le pareció un paraíso y tuvo que esforzarse para seguir con su trabajo de investigación. Contó allí con la ayuda de Esmerilda García Delicado y Magdalena Torres, a las que más tarde trajo con ella a Madrid. Sacaron adelante novedades relacionadas con los transportadores de nucleósidos (adenosina) en tejidos neurales, publicadas preferentemente en *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, *Cancer Research* y *Diabetes USA*.

En 1985 logró, de nuevo por oposición, Cátedra de Bioquímica y fue en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, a la que se trasladó en Julio de 1986. Su interés científico se centró entonces, durante algún tiempo, en la regulación de los transportadores neurales de adenosina, y su modulación por protein-quinasas y protein-fosfatasa; también acapararon su atención los transportadores de membrana vesicular para almacenar nucleótidos. De estos estudios surge el reconocimiento de los primeros transportadores con regulación mnemónica, publicados en *Biochemistry*, *Journal of Biological Chemistry (JBC)* y *FASEB Journal*. Fueron sus colaboradores en este área, Javier Gualix, Dolores Fideu y Raquel Pérez Sen entre otros.

Posteriormente, objeto de sus afanes fue la función de los nucleótidos y dinucleótidos de adenina como transmisores nerviosos. Se analizaron los diadenosina

polifosfatos, por vez primera, almacenados en el sistema nervioso y se establecieron colaboraciones con el grupo de Zimmermann en Frankfurt, para analizar el comportamiento de las vesículas colinérgicas. La presencia de receptores ionotrópicos presinápticos para el ATP y los dinucleótidos en el Sistema Nervioso Central, fue descrita por M<sup>a</sup> Teresa Miras en colaboración con Jesús Pintor. La respuesta medida en célula única en neuronas, astrocitos e incluso terminales sinápticas individuales, ha colocado a su equipo entre los punteros del saber de la respuesta a nucleótidos y caracterización e interacciones de receptores. Esto le ha permitido establecer relaciones fructíferas y publicaciones conjuntas con grupos tan relevantes como el de Burnstock del University College –ahora en el Autonomic Neuroscience Institut del Royal Free Hospital de Londres-, Krishtal en el Bogomoletz Institute de Kiev, Riveiro de la Fundación Gulbenkian- ahora en la Universidad de Lisboa-, Boeynaems de la Universidad Libre de Bruselas etc...

Fruto copioso y de calidad de su ardua y entregada acción investigadora son sus múltiples publicaciones en revistas nacionales y foráneas. El balance de artículos en español, francés e inglés alcanza hasta la fecha, la cantidad de 152, que engloba un período de 27 años que van desde 1973 hasta el 2000. Esta labor investigadora se ha visto respaldada por veintiséis proyectos de investigación financiados como investigador principal, que van desde 1984 sobre metabolismo de tejidos neurales y tumorales sometidos a procesos de diferenciación, hasta el año 1999-2001, acerca de la caracterización de receptores nucleotídicos (P2X y P2Y) y de dinucleotidos ( P2D y P4) en modelos neurales e interacción con otros sistemas de neurotransmisores. En relación con ello hay que consignar la dirección de once tesinas de licenciatura y de igual numero de tesis doctorales en las Facultades de Ciencias, Farmacia y Medicina de las Universidades de Madrid y Murcia.

En íntima conexión con lo anterior pueden citarse sus capítulos de libros, hasta un total de quince, en editoriales como John Wiley and Sons, Pergamon Press o Plenum Press. Las conferencias y comunicaciones orales a congresos, se saldan, por ahora, con la cifra de 70 y cubren un período de un cuarto de siglo: 1975-2000.

## II

En cuanto al conocer de M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal hemos recordado sus actividades como alumna y captadora de conocimientos tan varios como completos y exigentes. En lo que atañe a su hacer ahí está su ya meritoria labor docente e investigadora. Es seguro que empezó y ha continuado bien pero, asimismo, es cierto que los hábitos operativos buenos requieren tiempo y fatiga; los nobles propósitos, los deseos enardecidos no bastan. Por ello el estudio ponderado de sistemas de trabajo ha sido meta principal de su investigación constante y motivo feliz, como ha quedado referido, de numerosas y escogidas publicaciones con sus colaboradores, bien recibidos por la crítica nacional y foránea. Tales circunstancias han traído aneja su participación en muy distintas y prestigiosas entidades. Por ejemplo, ha trabajado en el extranjero en los centros siguientes: **Centro de Neuroquímica** de Strasbourg en Francia; **National Institutes of Health (NIH)** en Bethesda, Maryland; **Instituto Gulbenkian de Ciencias** en Oeiras, Portugal; **Zoologisches Institut**, Johann Wolfgang Goethe Universität en Frankfurt am Main; **Physiologisches Institut** en la Facultad de Medicina de la Universidad de Dusseldorf; **Autonomic Neurosciences Institut** del Royal Free Hospital, de Londres y el **Bogomoletz Institut of Science** de Kiev en Ucrania, etc.

Sus dotes en las faenas de organización han quedado bien puestas de manifiesto en otras numerosas ocasiones, entre ellas las que siguen: Simposio sobre Purinergic Neurotransmission, en el Congreso de la Sociedad Americana de Neuroquímica, en Houston Texas en 1992; Curso Internacional de la Fundación Ramón Areces sobre Transmisión Nerviosa Purinergica en Madrid 1993; el 11<sup>th</sup> Congreso de la European Society for Neurochemistry, Groningen Holanda, 1996; el XX Congreso de la SEBBM en Madrid 1997; Simposio de Nucleotides as Neurotransmitters en la 12<sup>th</sup> Congreso de la Sociedad Europea de Neuroquímica en San Petersburgo, 1998; Workshop sobre Purinergic Neurotransmission, Joint Meeting ISN,ESN en Berlín, Alemania, 1999; Congreso Internacional Purines 2000, en Madrid, etc.

M<sup>a</sup> Teresa Miras ha sido miembro del jurado de la Unión Europea para la concesión del premio EU Contest for Young Scientists, Miembro del Comité Científico del North Atlantic Treaty Organization (NATO-OTAN), y fundadora del Purinergic Club.

### III

En ésta, obligadamente, corta exposición he intentado esquivar los escollos que, una vez y otra vez, salen al paso en la difícil singladura que es la glosa breve y acertada de las relevantes características humanas y científicas de la Dra. Miras. Para mí una de ellas es la serenidad, que no hay que identificar con la indiferencia. Cuando algo no nos importa podemos alardear de prudencia y sensatez. Una paradoja de Edgar Allan Poe nos expresa que la prudencia debe de contar siempre con lo imprevisto. La serenidad de la recipiendaria María Teresa Miras va unida a una gran e imprevista actividad, refrendada por el público aprecio a su persona y a sus hechos, tanto en España como en el extranjero. Como ya exponemos en otros apartados, sus publicaciones científicas, recogidas en revistas del mayor prestigio internacional, son relevantes, y otro tanto diríamos de sus contribuciones a congresos especialmente fuera de España. Del mayor interés son igualmente sus revisiones de conjunto, conferencias, seminarios, cursos y demás ejecutoria similar.

Sin pretensiones exhaustivas, que estarían fuera de lugar, procuro recoger en las líneas que siguen esquemáticamente otras contribuciones del afamado trabajo científico de M<sup>a</sup> Teresa Miras. Ha colaborado intensa y estrechamente, y es miembro de las destacadas instituciones científicas españolas y extranjeras que se relacionan: Sociedad de Biofísica de España (SBE), Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), Sociedad Española de Neurociencias (SEN), European Society for Neurochemistry (ESN), International Society for Neurochemistry (ISN) etc.,. En lo que respecta a las reiteradamente aludidas relaciones internacionales basta citar los datos que se recogen: Miembro electo del Council de la European Society for Neurochemistry; miembro electo del Council de la International Society for Neurochemistry; del Advisory Board del Molecular and Cellular Biology of Chromaffin cells; del Advisory Board del Purinergic Club, del P2Y Receptor IUPHAR Subcommittee y del Editorial Board del Journal of Neurochemistry. Asimismo, ha ocupado el cargo de Presidente de la Ponencia IV de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y además un largo etcétera, donde podrían incluirse otros nombramientos y honores del más distinto tipo, que debo omitir por obvias razones de

espacio y tiempo.

#### IV

El buen conocer y hacer de M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal se hace patente en el excelente discurso de ingreso que acabamos de escuchar en esta Real Academia de Farmacia. Su versión de las funciones extracelulares del ácido adenosíntrifosforico o ATP y de otros nucleótidos, es a todas luces sugerente y en versión plenamente actualizada. Una puesta al día de este tema, como la por ella aquí llevada a cabo, es tan meritoria como digna de agradecimiento.

El adenosina 5' trifosfato o ATP como eje central del metabolismo energético ha suscitado, desde siempre, una atención extraordinaria. Me refiero principalmente a su función intracelular. El ATP es esencial en muy diversos procesos dentro de célula, entre otros los que siguen: regulador de las funciones proteínicas como sustrato de proteínquinasas; ligando alostérico; mantenedor de los gradientes iónicos de membrana; biosíntesis de macromoléculas; precursor de los eslabones del RNA y del DNA...

En cuanto a sus funciones extracelulares y ante la magistral disertación que acabamos de escuchar permítaseme que recoja algunos complementarios y sucintos datos.

Si bien es cierto que los trabajos de Drury y Szent Giorgyi de 1929 se consideran como los más tempranos en destacar que los nucleótidos y la adenosina podrían tener efectos extracelulares, como mensajeros, la verdad es que se les dio poca relevancia y lo mismo sucedió en los años 50 con los de Pamela Holton, sobre la estimulación de los nervios sensitivos mediada por nucleótidos.

EL reconocimiento del ATP como mensajero y neurotransmisor se debe a Burnstock, quien describió la intervención de los nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos en el sistema digestivo y urinario. Otro cambio en el pensamiento sobre la neurotransmisión surge cuando Burnstock crea el término **co-transmisión**. Fue un concepto poco aceptado al principio, pues la simplicidad de una neurona / un transmisor, era del gusto de casi todos los investigadores. Este nuevo concepto permitía dar una función a los nucleótidos co-almacenados con neurotransmisores clásicos

(adrenalina, noradrenalina, acetilcolina). De este modo los acompañantes nucleotídicos, pasado el tiempo, se convertían en los verdaderos actores dado que en el caso de las catecolaminas, éstas solo tienen receptores metabotrópicos, mientras que el ATP es capaz de actuar como neurotransmisor rápido despolarizando las neuronas ó células musculares post-sinápticas. En las vesículas de secreción aminérgica el grupo de María Teresa Miras encontró por primera vez, en tejidos neurales, los diadenosin polifosfatos, para los que han propuesto una función neurotransmisora.

Enlazando con lo que acabamos de referir el citado equipo ha estudiado también el transporte de nucleótidos y dinucleótidos a vesículas de secreción, mediante técnicas fluorescentes y citometría de flujo, y ha conseguido comprobar la existencia de un complejo sistema de transporte con características mnemónicas. No obstante sigue pendiente de resolver como y mediante que proteínas pueden salir el ATP y el UTP citosólico al espacio extracelular, puesto que son señales extracelulares esenciales como señalización paracrina en células gliales, endotelios vasculares y epitelios de las vías respiratorias y digestivas, como ha aclarado Richard Boucher y sus colaboradores.

La primera clasificación de los receptores de nucleótidos en P2X y P2Y, que se corresponden con la familia de ionotrópicos y de metabotrópicos, se debe igualmente al ya citado Burnstock. Gracias a las técnicas de biología molecular se ha resuelto la secuencia de aminoácidos, antes de tener desarrollada una mínima farmacología. La mayoría de los receptores se conocen desde hace años y la farmacología se desarrolló poco a poco: adrenérgicos con cardiovascular, dopaminérgicos con funciones nerviosas centrales, antihistamínicos, muscarínicos, serotonina con los hemostáticos y nuevos antidepressivos, etc.,. Aquí se ha empezado al revés y quizás debiera decirse con Pirandello: *“Receptores en busca de función”*

El desarrollo de la familia P2Y y conocimiento de sus miembros se debe fundamentalmente a Jean Marie Boeynaems de Bruselas, y el de Kendal Harden en North Carolina. Este último ha investigado todo lo referente a la señalización con nucleótidos de uridina y los segundos mensajeros que utilizan estos receptores en la transducción de la señal, fundamentalmente a través de fosfatidil-inositol-fosfolipasa C , con generación del inositol trifosfato, salida de calcio del retículo y activación de PKC. Sin embargo pueden ser mucho más promiscuos, activando ó inhibiendo la adenilato

ciclasa, según el sistema celular en que se estudie. A este respecto, existe todavía confusión en el número de los receptores P2Y, y es posible que se incorporen más miembros en un futuro.

El descubrimiento de la estructura y clonación de los receptores de la familia P2X se debe principalmente al grupo de Alan North y su esposa Annmarie Surprenant, cuando trabajaban en Glaxo de Basilea. El primer P2X, número uno se clonó de vaso deferente, primer modelo de estudio de Burnstock, y su estructura es de la máxima simplicidad. Se supone por su analogía con los canales de  $K^+$  y de  $Na^+$  que es uno de los que han aparecido antes en la evolución. Como ha citado M<sup>a</sup> Teresa Miras se han generado animales en los que no se expresa el gen del receptor P2X<sub>1</sub> (*knock-out*) y que son perfectamente viables, además su esperma es fértil, pero ellos son estériles, pues el conducto deferente no puede contraerse para lanzar el esperma en la eyaculación, si bien son plenamente potentes. Esto ha dado lugar a que sea una diana de estudio de la píldora antifertilidad masculina. El *knock-out* del gen P2X<sub>3</sub>, era uno de los más deseados y se ha conseguido por partida doble: el grupo de Debra Cockayne en Palo Alto, California y el de Veronica Souslova en el University College de Londres. El interés reside en que el receptor P2X<sub>3</sub> es muy abundante en las sinapsis de las neuronas sensitivas y se pensaba podría ser una excelente diana farmacológica para el tratamiento del dolor. Las cosas han resultado de otro modo y parece ser que este receptor está relacionado con las sensaciones y se libera ATP, cuando estas son placenteras. Igualmente es la señal que indica la presión de orina en la vejiga, que hace salir ATP de los epitelios tapizantes y actúa como agonista sobre los receptores P2X<sub>3</sub> que son abundantes en las terminales de los nervios de la vejiga, produciéndose la estimulación nerviosa que da cuenta de la necesidad fisiológica. Las compañías farmacéuticas se están ocupando actualmente de la farmacología de este receptor, pues los problemas de incontinencia urinaria son cada vez más graves en una población envejecida.

No quiero cerrar estas breves disquisiciones sin resaltar que el trabajo que M<sup>a</sup> Teresa Miras ha sido copioso en tratar de aclarar que los diadenosina polifosfatos son transmisores nerviosos y la metodología en terminal nerviosa única supone un considerable avance. La síntesis por su equipo de un nuevo compuesto inhibidor el diinosina pentafofosfato (Ip<sub>5</sub>I) capaz de inhibir en el rango nanoM los receptores de dinucleótidos y también los homoméricos P2X<sub>1</sub>, representa un hito en la farmacología

para diferenciarlos de los P2X<sub>3</sub>, que son los que existen en terminales nerviosas de cerebro.

## V

La altisonancia, y no el noble empaque, es a veces sinónimo de actos similares al que ahora celebramos. Estimo que esta tarde es ocasión de celebrar con solemnidad el que esta tribuna académica se enriquezca con una aportación tan enjundiosa. Todo ello transido de un cordial sentimiento de amistad, que en modo alguno significa contubernio; muy al contrario quiere representar aquella manifestación que Aristóteles veía capaz de una triple concurrencia: placer, conveniencia y benevolencia. Al dar la bienvenida a M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal se nos actualiza ese contenido plural y jugoso. Grande es el placer que nos proporciona el que ocupe esta añeja e ilustre tribuna y no hemos perdido de vista la conveniencia que supone convivir con tan recia personalidad; nuestro interés es por ello, paradójicamente desinteresado. Solamente nos falta, seguir la pauta aristotélica con la nota de benevolencia, que debemos sustituir por la de justicia, ya que ésta se ha hecho al reconocer, otra vez más, a la Dra. Miras su indudable y positiva realidad científica y profesoral.

Quisiera, y espero, que esta presentación mía haya sido oportuna y, al mismo tiempo, objetiva. He buscado detenerme con respeto ante el santuario de su mundo interior. No obstante, desearía informar a unos y recordar a otros, que a sus dotes de investigadora y jefe de escuela científica une inmejorables cualidades: es cortés, moderada en su decir, entusiasta y perseverante. Su sabiduría no incluye el conformismo, por lo que guarda siempre su juventud de espíritu reflejada en sus variopintos cargos de ejemplar responsabilidad directiva.

Parece que el vocablo “intelectual” debiera aplicarse con rigor etimológico a cuantos utilizan el intelecto en cualesquiera acción. La realidad es que suele restringirse semánticamente su valor al uso de la inteligencia en alto grado. Ello da lugar a que los intelectuales constituyan un grupo minoritario de méritos sobresalientes, y dentro de este concepto creo que hemos podido comprobar suficientemente que entra M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal. Debo igualmente ratificar que nuestra nueva compañera académica

cumple con plenitud las tres condiciones que exige, fundamentalmente, el espíritu académico: competencia, amor a la tradición y sentido crítico; esto es, la triada aneja a la auténtica sabiduría. A tan buen ser y estar ha contribuido sustancialmente su distinguido esposo, Fernando Varela, Catedrático de Geometría y Topología Diferencial de la Universidad Autónoma de Madrid, pleno de discreción, eficacia y comprensión. Por su parte María Teresa ha hecho realidad matrimonial las palabras de Flaubert: *Je crois que la bonheur se trouve avec une bonne femme*. Exponente merecido y feliz de este envidiable cuadro conyugal son sus dos hijos que enriquecen el entorno: Fernando, licenciado en derecho y Alberto, alumno de último curso de la Escuela Superior de Ingenieros de Caminos.

Excmo. Sr. Director,

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

Señoras y Señores:

Como expresivo colofón de este mi exponer, considero que debo incluir una escueta y específica referencia conectada con la jornada académica que esta tarde protagonizamos. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal es la cuarta mujer que viene a formar parte de esta Real Academia en el Instituto de España y lo hace de mi mano, como lo fue la primera: María Cascales Angosto, hecho singular del que orgullosamente me responsabilizo y congratulo. Acontecer aunque insólito en nuestras tierras ibéricas no deja por ello de ser, simultáneamente, algo tan conforme a la razón como laudable. Y no rompiendo moldes y sí abriendo caminos.

Y permitidme además, que remate mi decir en esta ocasión con el recuerdo de algo de la bella lírica galaica de Rosalía de Castro:

*“Dend eiquí vexo un caminho  
que non sei adonde vai;  
po lo mesmo que non sei  
quixera o poder andar”*

No es aventurado vaticinar que María Teresa sabrá, en todo momento, andar un camino académico seguro, brillante y solidario en esta Real Corporación. Yo, en nombre de todos, así se lo deseo. Y espero, dada su envidiable inquietud vital, que su andadura sea continuada, larga, fértil y venturosa.

He dicho.

Madrid 26 de Diciembre de 2000.