

TESIS DOCTORAL 2016/ 2017

“REGULACIÓN DEL TRANSPORTADOR  
NEURONAL DE GLICINA GlyT2 POR EL  
RECEPTOR P2X3. PAPEL EN DOLOR”

Memoria presentada por la licenciada Lucía Villarejo López  
para optar al título de Doctor en Ciencias.

Director de la Tesis:  
Dra. Beatriz López-Corcuera

Este trabajo ha sido realizado en el departamento de  
Biología Molecular –Neuropatología Molecular, Centro de  
Biología Molecular Severo – Ochoa” (C.S.I.C – U.A.M)



La Doctora Beatriz López-Corcuera, profesora titular del departamento de Biología Molecular / Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid Certifica:

Que Lucía Villarejo López, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el departamento de Biología Molecular - Centro de Biología Molecular Severo Ochoa - Universidad Autónoma de Madrid, el presenta trabajo de investigación titulado “REGULACIÓN DEL TRANSPORTADOR NEURONAL DE GLICINA GlyT2 POR EL RECEPTOR P2X3. PAPEL EN DOLOR” como tesis doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Marzo 2017

Vº Bº DIRECTOR:

Dra. Beatriz López-Corcuera

La interesada:

Lucía Villarejo López.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN .....	11
1. EL SISTEMA NERVIOSO, NEURONAS Y SINAPSIS.....	13
2. NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA. ....	14
2.1.- RECEPTORES DE GLICINA: almacenamiento, liberación y recaptación de glicina. 16	
2.2.- TRANSPORTADORES DE GLICINA. ....	17
3. DOLOR.....	22
3.1. – DOLOR, FIBRAS SENSORIALES Y VÍAS NOCICEPTIVAS.....	22
3.2.- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO (ON) EN DOLOR.....	24
3.3.- PAPEL DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN DOLOR.....	25
4. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR.....	26
4.1.- ALMACENAMIENTO, LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS 27	
4.2.- RECEPTORES DE ATP: RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X.....	28
OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. CULTIVOS CELULARES. ....	45
2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS.....	45
3. INFECCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS.....	46
4. ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	47
5. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS. ....	47
6. INMUNOHISTOQUÍMICA. ....	48
7. EXPERIMENTOS DE MICROFLUORIMETRÍA DE CALCIO .....	48
8. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA.....	48
9. ANTICUERPOS.....	49
10. BIOTINILACIÓN: MARCAJE DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CELULAR CON BIOTINA.....	49
11. INMUNOPRECIPITACIÓN EN CLUTIVOS CELULARES Y DETECCIÓN DE PROTEÍNA UBIQUITINADA. ....	50
12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS NITROSILADAS. ....	51
13. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE GLICINA. ....	52
14. ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES.....	53
15. EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA. ....	54

16.	AGONISTAS DE P2: Farmacología de receptores purinérgicos .....	55
17.	PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.....	56
18.	HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS. ....	57
	RESULTADOS .....	59
1.	EFFECTO DEL AGONISTA DE P2X3 – P2X2/3 ( $\beta\gamma$ -meATP) SOBRE EL TRANSPORTADOR NEURONAL DE GLICINA GlyT2. ....	61
2.	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE P2X3 Y GlyT2. ....	63
3.	FARMACOLOGÍA:.....	64
3.1.-	ESPECIFICIDAD DE $\beta\gamma$ -meATP EN CÉLULAS 1321N1 TRANSFECTADAS CON RECEPTORES PURINÉRGICOS. ....	64
3.2.-	_ESPECIFICIDAD DE $\beta\gamma$ -meATP EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES. .	66
4.	RECEPTORES PURINÉRGICOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GlyT2. ....	67
4.1.-	P2X2/3 Y P2X2: $\beta\gamma$ -MEATP Y 2MES-ATP. ....	68
4.2.-	P2X2/3 Y P2Y1: $\alpha\beta$ -MEATP Y 2MES-ADP. ....	69
4.3.-	RECEPTORES P2 IONOTRÓPICOS Y METABOTRÓPICOS: ATP Y ADP.....	71
4.4.-	NEUROESTEROIDES: dehidroepiandrosterona (DHEA) y progesterona (PRO).....	72
4.5.-	CONSECUENCIAS DE LAS VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X3: cultivos enriquecidos en DRGs o shRNA interferencia.....	73
5.	EFFECTO DE $\beta\gamma$ meATP SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA. ....	75
6.	ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN ENTRE P2X3 y GlyT2. ....	78
6.2.-	CALCIO Y CANALES DE CATIONES.....	80
6.3.-	LIBERACIÓN DE VESÍCULAS SINÁPTICAS: GLUTAMATO Y GLICINA.....	83
6.4.-	ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	86
7.	ESTUDIO DE POSIBLES RUTAS QUE INTERACCIONAN:.....	94
7.1.-	RECEPTORES DE GABA. ....	94
7.2.-	RECEPTORES MUSCARÍNICOS (mACh).....	96
7.3.-	PROSTANOIDES Y OTROS MEDIADORES INFLAMATORIOS. ....	97
	DISCUSIÓN.....	103
	CONCLUSIONES .....	121
	RESUMEN.....	123
	SUMMARY .....	124
	AGRADECIMIENTOS. ....	125
	BIBLIOGRAFÍA.....	127

# ABREVIATURAS.

**AA:** ácido araquidónico.

**ADP:** adenosín difosfato.

**AMPA:** receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico, receptor AMPA.

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico.

**APV:** ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico.

**AraC:** citosina arabinósido (*cytosine arabinoside*).

**ATP:** adenosin trifosfato.

**BSA:** albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*).

**CaMKII $\alpha$ :** proteína kinasa II $\alpha$  dependiente de calcio – calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha*)

**CASK:** serin-kinasa de membrana dependiente de calcio – calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent-serine protein Kinase*).

**CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Calcitonin gene-related peptide*)

**CNX:** intercambiador sodio, calcio ( $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -exchanger).

**COX:** ciclooxigenasa.

**p-CREB:** factor de transcripción de respuesta a AMP cíclico fosforilado (*cAMP response element-binding*).

**DAT:** transportador de dopamina.

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona.

**DIV:** días in vitro

**DMEM:** Eagle modificado por Dulbecco

**D10:** DMEM suplementado al 10% con suero fetal bobino.

**DNQX:** 6,7-dinitro-quinoxalino-2,3-diona, antagonista de receptores de glutamato tipo AMPA / Kainato.

**DRG:** glanglios de la raíz dosal (*dorsal root ganglia*).

**DTT:** ditionitrosol.

**EC50:** dosis de actividad medía.

**EDTA:** ácido etilendiamino-tetraacético

**EGTA:** ácido etilenglicol-tetraacético.

**ERK:** kinasa regulada extracelularmente (*Extracellular signalling regulated kinases*).

**FBS:** suero fetal bovino

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GABA<sub>A</sub>:** receptor ionotrópico de ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

**GABA<sub>B</sub>:** receptor metabotrópico de ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GCs:** guanilato ciclasa soluble.

**GlyR:** receptor de glicina.

**GlyT:** transportador de glicina.

**GlyT1:** transportador de glicina glial.

**GlyT2:** transportador de glicina neuronal.

**GMPc:** guanidin monofosfato cíclico.

**GPCR:** receptores asociados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*).

**HBSS:** solución salina equilibrada de Hank's (*Hanks' Balanced Salt solution*).

**HCSS:** solución salina-HEPES (*HEPES Controlled Salt Solution*).

**IB4:** isolectina B4 característica de fibras C no peptidérgicas.

**IP2:** inositol bifosfato.

**IPSCs:** corriente postsináptica inhibidora simples (*inhibitory postsynaptic currents*).

**LPS:** lipopeptido bacteriano.

**MAPK:** proteína kinasas activadas por Mitógenos.

**MEK:** serina/tirosina/treonina kinasa perteneciente a las MAPK.

**mGlu3R:** receptor metabotrópico tipo 3 de glutamato.

**min:** minutos.

**mIPSCs:** corrientes postsinápticas inhibidoras miniatura.

**NAAG:** N-acetilaspargilglutamato, agonista de mGlu3t

**NAGly:** lípido N-araquidonoilglicina, endocannabinoide.

**NB27:** medio de cultivo celular neurobasal con suplemento comercial B27.

**NEM:** N-etilmaleimida.

**NFPS:** N - [3 - (4' - fluorofenil) - 3 - (4'-fenilfenoxi) propil sarcosine; también conocido como ALX5407, inhibidor de GlyT1.

**NMDA:** receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato.

**NT:** neurotransmisor.

**NOS:** óxido nítrico sintasa.

**ON:** óxido nítrico.

**P2:** receptores purinérgicos que responden nucleótidos.

**P2XR:** receptor purinérgico ionotrópico P2X.

**P2YR:** receptor purinérgico metabotrópico P2Y.

**pA:** potencial de acción.

**PBS:** tampón fosfato salino.

**PBSc:** tampón fosfato salino completo con calcio y magnesio.

**PDE-5:** fosfodiesterasa 5.

**PGE2:** prostaglandina E2.

**PKA:** proteína kinas A dependiente de AMPc.

**PKC:** proteína kinasa C.

**PKG:** proteína kinasa G dependiente de GMPc.

**PLA2:** fosfolipasa 2.

**PLC:** fosfolipasa C.

**PLD:** poli-D-Lisina.

**PLL:** poli-L-Lisina.

**PMCA:** ATPasa de calcio neuronal de membrana plasmática (*neuronal plasma membrane Ca<sup>++</sup>-ATPase*).

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

**PPSI:** potencial postsináptico inhibidor.

**PRO:** progesterona.

**shRNAi:** ácido ribonucleico de interferencia de horquilla corta (*short hairpin Ribonucleic acid*)

**SEM:** error estándar de la media (*standard error of the mean*).

**SDS:** docecil sulfato sódico.

**SN:** sistema nervioso.

**SNC:** sistema nervioso central.

**SNP:** sistema nervioso periférico.

**SNP:** sodio nitroprusiato o pitroprusiato, donador de óxido nítrico.

**SP:** sustancia P.

**sIPSCs:** corriente postsináptica inhibidora simples espontánea (*spontaneous inhibitory postsynaptic currents*).



**TM:** transmembrana, hace referencia al algún segmento transmembrana de alguna proteína.

**TTX:** tetrodotoxina.

**VIAAT:** transportador vesículas de aminoácidos inhibidores (*vesicular inhibitory amino acid transporter*).



# **INTRODUCCIÓN.**



## **1. EL SISTEMA NERVIOSO, NEURONAS Y SINAPSIS.**

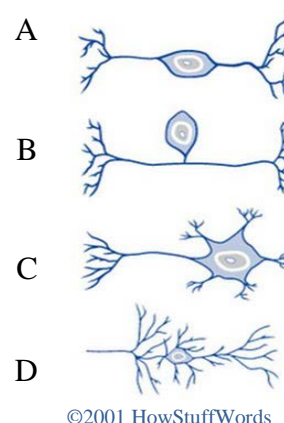
El sistema nervioso (SN) es una red de tejidos que tiene la capacidad de controlar y coordinar los demás órganos para determinar una respuesta del individuo ante su entorno. Anatómicamente se divide Sistema Nervioso Periférico (SNP) y en Sistema Nervioso Central (SNC). El SNP está formado por los nervios raquídeos y los nervios craneales que se encargan de recibir la información del entorno y del propio organismo. Esta información es conducida hasta el SNC, constituido por la médula espinal y el encéfalo. Ya en la médula espinal, la información se organiza anatómicamente para llegar hasta el cerebro que se encarga de integrar las señales y elaborar una respuesta.

Desde el punto de vista funcional, el sistema nervioso se clasifica en: (1) sistema nervioso somático que corresponde al conjunto de neuronas que regulan las funciones voluntarias y conscientes del organismo, y (2) sistema nervioso autónomo (visceral o vegetativo) formado por las neuronas que regulan las funciones involuntarias o inconscientes. A su vez, el sistema autónomo se subdivide en (2a) sistema nervioso parasimpático: se encarga del mantenimiento del estado de reposo; está formado por el nervio vago (región sacra y craneal), y su principal neurotransmisor es la adrenalina y acetilcolina; y (2b) sistema nervioso simpático: activa el estado de alerta, sus fibras se distribuyen desde la región T1 (1ª vértebra torácica) a L2 (2ª vértebra lumbar), y su principal neurotransmisor es la acetilcolina.

El sistema nervioso está compuesto principalmente por dos tipos celulares: células gliales y neuronas. Se considera a la neurona como la unidad anatómica y funcional del SN y, aunque comparte con el resto de tipos celulares los orgánulos más comunes, es una célula altamente especializada. Morfológicamente se compone de soma (cuerpo celular), dendritas y axón, y según su forma puede clasificarse en distintos tipos (figura i1).

### **Figura i1. Principales tipos neuronales según su morfología:**

- A) Neuronas bipolares: forma característica de las interneuronas.
- B) Neuronas pseudounipolares: células sensoriales características de los ganglios de las raíces dorsales (DRG).
- C) Neuronas multipolares.
- D) Neuronas piramidales.

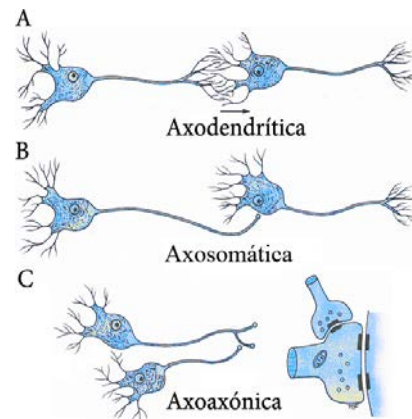


©2001 HowStuffWords

Las neuronas se caracterizan por ser células eléctricamente excitables con capacidad de generar, conducir y transmitir impulsos nerviosos. La transmisión de la información de célula a célula, se lleva a cabo a través de la sinapsis: diferenciación morfológica y funcional constituida por la terminación de un axón que se ensancha (botón presináptico) y por el elemento postsináptico en aposición, este puede ser la membrana de un cuerpo celular, de una dendrita o de un axón de otra neurona (figura i2). Entre membranas pre- y postsinápticas existe un espacio de entre 20 a 50nm (hendidura sináptica).

**Figura i2. Principales tipos de sinapsis:**

- A) Sinapsis axo-dendrítica: es la más común.
- B) Sinapsis axo-somática.
- C) Sinapsis axo-axónicas: este tipo se localiza mayoritariamente en las astas dorsales de la médula espinal (Hughes, Sikander et al. 2012). Contienen tanto GABA como glicina (Todd 1996, Watson, Hughes et al. 2002, Watson 2004).



<http://neuroanatomia.info/sinapsis.html>

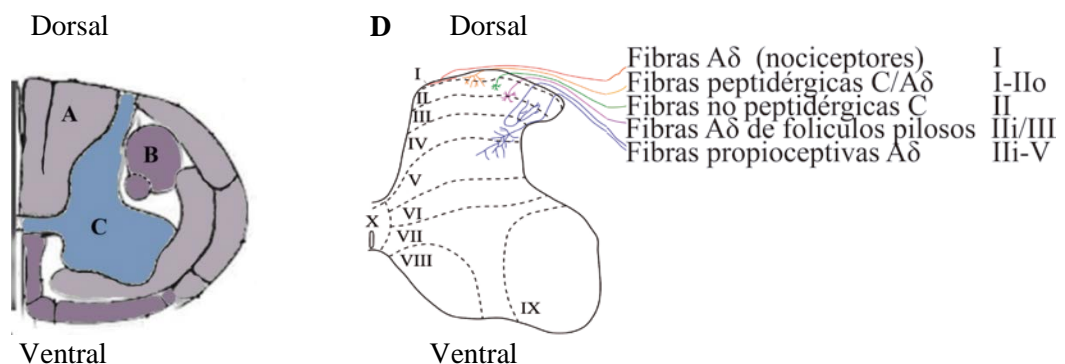
En la mayor parte de las sinapsis químicas la comunicación se realiza a través de sustancias conocidas como neurotransmisores (NTs). Los principales tipos de NTs son: 1- derivados de aminas (dopamina, serotonina, noradrenalina); 2- aminoácidos (glutamato, glicina, ácido gamma – aminobutírico); 3- purinas (ATP, adenosina); 4- pequeños péptidos de entre 3 y 30 aminoácidos (sustancia P, somatostatina); 5- pequeñas moléculas (acetilcolina). El mecanismo de acción de los NTs implica: liberación del NT, unión al receptor postsináptico específico, activación (o inhibición) de la neurona postsináptica y terminación de la señal bien mediante acción de enzimas específicas que destruyen el neurotransmisor, o mediante transportadores específicos neuronales y/o gliales que lo retiran de la hendidura sináptica.

**2. NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA.**

La glicina es el principal neurotransmisor inhibitor en áreas caudales del SNC como el tallo cerebral, la zona pontinocerebelosa y la médula espinal. La neurotransmisión glicinérgica tiene un importante papel en el procesamiento de la información sensorial y motora (Legendre 2001). Participa en el procesamiento de la información auditiva (Ottersen and Storm-Mathisen, 1990), de la información visual en las células ganglionares de la retina (Han, Zhang et al. 1997, Protti, Gerschenfeld et al. 1997) y en la percepción del dolor neuropático e inflamatorio (Aragon

and Lopez-Corcuera 2003, Foster, Wildner et al. 2015). Además, controla la generación de ritmos motores, la coordinación de respuestas reflejas espinales y el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas. Aparte de su papel inhibitor, la glicina puede actuar como neurotransmisor excitador al ser un coagonista obligado del receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato (NMDA) ya que es necesaria la unión de dos moléculas de glutamato y dos de glicina para conseguir la apertura eficiente del canal (Benveniste and Mayer 1991, Clements and Westbrook 1991, Madden 2002).

Las interneuronas glicinérgicas se encuentran en el tallo cerebral y la médula espinal formando una serie de contactos sinápticos locales con neuronas aferentes sensitivas, interneuronas excitadoras e inhibitoras y con proyecciones neuronales ascendentes y descendentes de las áreas superiores del SNC. Esta red de contactos locales interneuronales se ha determinado como un primer punto de control de la transmisión sensorial, ya que puede favorecer o no la propagación de la información. Es lo que se ha denominado “teoría de compuerta espinal” propuesta por Melzack y Wall en 1965 (Melzack and Wall 1965).



Nat Rev Neurosci. 2010. 11(12): 823–836

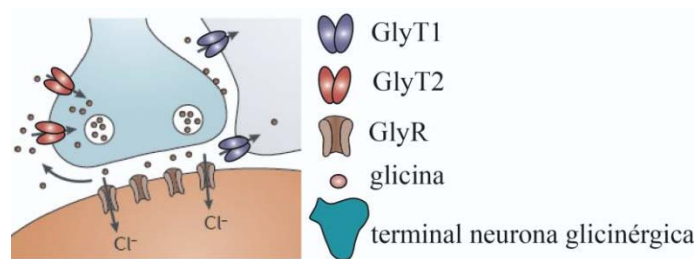
**Figura i3. Áreas descritas en un corte transversal de la médula espinal:** la información que llega a la médula espinal se organiza anatómicamente. A grandes rasgos podemos diferenciar en la sustancia blanca (A, B) tractos ascendentes de información sensorial (A) e información descendente motora (B). La sustancia gris (C) se organiza en láminas de *Rexed* (I – X) (D); las astas dorsales de la médula espinal comprenden las láminas I-III de *Rexed* donde se procesa la información sensorial y la información de dolor procedente de las aferencias primarias. En la zona ventral hay un primer procesamiento de la información motora donde se originan los circuitos reflejos espinales entre otras funciones.

Los somas de las neuronas glicinérgicas se distribuyen a lo largo de todos los segmentos medulares; en la sustancia gris son especialmente abundantes los cuerpos celulares en las láminas V-VIII, y con menor densidad en las láminas III y IV (Hossaini, French et al. 2007) (figura i3). Sin embargo, sus proyecciones alcanzan a todas las láminas de *Rexed* y son capaces

de modular la información sensorial aferente (Zafra, Gomeza et al. 1995b, Todd 2010, Foster, Wildner et al. 2015), por ejemplo, las interneuronas espinales glicinérgicas del tipo Ia median circuitos reflejos de inhibición recíproca y permiten la relajación de músculos antagonistas y la contracción coordinada de músculos agonistas; y las interneuronas de Renshaw, regulan la excitabilidad de motoneuronas mediante la producción de señales inhibitoras cíclicas (Legendre 2001). Varios trabajos proponen que las interneuronas inhibitoras de las astas dorsales de la médula espinal son altamente selectivas en las interacciones y generan circuitos que regulan la neurotransmisión sensorial (Eccles, Eccles et al. 1961, Todd 1996, Zeilhofer 2005, Todd 2010, Zeilhofer, Wildner et al. 2012).

## 2.1.- RECEPTORES DE GLICINA: almacenamiento, liberación y recaptación de glicina.

La acción neurotransmisora de la glicina se desencadena tras la despolarización del terminal por la llegada de un potencial de acción (pA) y liberación del neurotransmisor contenido en vesículas sinápticas a la hendidura mediante exocitosis dependiente de calcio. La unión posterior de la glicina a su receptor sensible a estricnina (GlyR) produce la entrada de iones cloruro en la célula postsináptica generando un potencial postsináptico inhibitor (PPSI) que hiperpolariza la membrana e inhibe la posible excitación de la neurona postsináptica (figura i4).



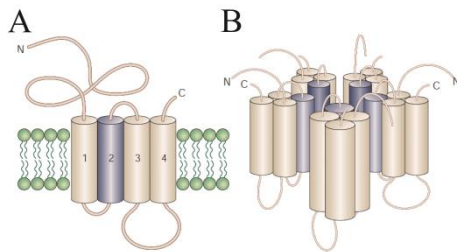
Nat Rev Drug Discov (2013) 12(11):866-85

**Figura i4. Sinapsis glicinérgica y receptor de glicina (GlyR).** Representación de una sinapsis glicinérgica inhibidora. En el terminal presináptico se representan las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor (NT) glicina. También se muestra el transportador neuronal de glicina GlyT2. El elemento postsináptico tiene receptores GlyR que dejan entrar cloruro al unirse la glicina provocando la hiperpolarización de la célula postsináptica. En la célula de glía adyacente, se representa el transportador glial de glicina GlyT1.

Los receptores de glicina pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando cuya estructura es heteropentamérica con dos subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$  ( $\alpha_2:\beta_3$ ) siguiendo una distribución  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  (Yang, Taran et al. 2012). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  comparten una misma estructura formada por un largo extremo amino terminal, cuatro dominios transmembrana



(TM1- 4) y un gran bucle intracelular entre los TM3 y TM4 (figura i5A) (Moss and Smart 2001, Dutertre, Becker et al. 2012). Los segmentos TM2 de cada monómero se orientan hacia el interior del pentámero para formar un canal selectivo a iones cloruro produciendo la hiperpolarización de la neurona postsináptica (figura i5B).



Nature Reviews Neuroscience (2001) 2:240-250

**Figura i5. Esquema del receptor de glicina (GlyR).** (A)

Los monómeros  $\alpha$  y  $\beta$  poseen la misma estructura: cuatro dominios transmembrana (TM1-4), un largo extremo amino terminal, y un gran bucle intracelular entre TM3 y TM4. (B) Cinco monómeros se organizan con su segmento TM2 (en azul) orientado hacia el interior formando un canal de cloruro.

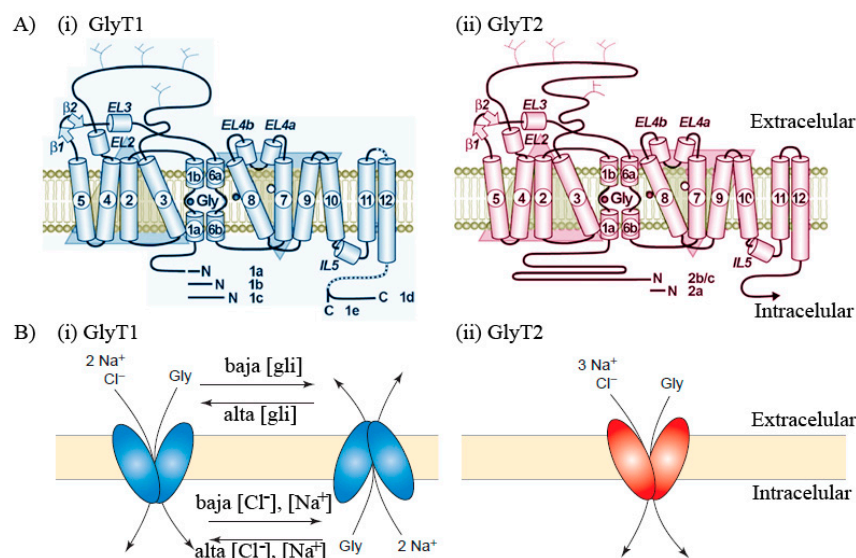
La acción inhibitoria de la glicina finaliza gracias a la recaptación del neurotransmisor desde el espacio sináptico por dos transportadores de membrana específicos, GlyT1 (isoforma mayoritariamente glial) y GlyT2 (isoforma neuronal) (figura i4) (Zafra, Gomez et al. 1995b). GlyT2 transporta glicina al interior del terminal presináptico para facilitar su reincorporación a las vesículas sinápticas, ayudando a preservar su contenido cuántico y permitiendo de este modo su reutilización (Han, Zhang et al. 1997). La glicina es introducida en vesículas sinápticas mediante la acción del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores, VIAAT (*Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*), que es también responsable del transporte vesicular de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). VIAAT posee una baja afinidad (mM) por la glicina, por lo que es necesario una elevada concentración de neurotransmisor en el terminal para el relleno de las vesículas sinápticas (Gasnier 2004).

## 2.2.- TRANSPORTADORES DE GLICINA.

La concentración de glicina en el espacio extracelular está regulada por los dos transportadores: GlyT1 y GlyT2 que la transportan con alta afinidad ( $\mu$ M). Ambos realizan un transporte activo, electrogénico, acoplado al gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  y dependiente de  $\text{Cl}^-$ . Para la correcta actividad del transportador, es esencial la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que genera y mantiene el gradiente de sodio a través de la membrana, fuerza electromotriz del transporte.

Desde el punto de vista estructural, GlyT1 y GlyT2 pertenecen a la familia SLC6 (*solute carrier 6*) junto con transportadores como los de GABA o monoaminas (Kristensen, Andersen et al. 2011). Son glicoproteínas homólogas (48% identidad de secuencia) con 12 TMs y extremos amino y carboxilo intracelulares que comparten la estructura 3D inicialmente descrita en el

homólogo procariota LeuT<sub>Aa</sub> (Yamashita, Singh et al. 2005) y posteriormente en el transportador de dopamina de *Drosophila* (dDAT) (Penmatsa, Wang et al. 2013) y el transportador de serotonina humano (hSERT) (Coleman, Green et al. 2016). El plegamiento presenta dos grupos de cinco TMs invertidos topológicamente que se entrelazan para formar dos haces de cuatro TMs, uno móvil (*core*) y uno más estático (*scaffold*) (Rudnick, Kramer et al. 2014). Durante el ciclo de transporte, la proteína con sitios de unión a sustrato e iones centrales, se abre a un lado de la membrana para cargar sustrato/s y luego al lado opuesto para liberarlos sufriendo cambios conformacionales durante esta transformación (modelo de acceso alternativo, (Jardetzky 1966)). Las hélices TM1 y TM6 están parcialmente desenrolladas en la región central y conforman los sitios de unión a los cosustratos (Perez-Siles, Morreale et al. 2011, Perez-Siles, Nunez et al. 2012). Los extremos terminales son las regiones de mayor diversidad entre los miembros SLC6 y tienen un papel relevante en tráfico de proteínas y especificación de variantes. En los GlyTs se han identificado diferentes isoformas que afectan a estas regiones (figura i6A).



(A) Dohi T et al. (2009) *Pharmacol Ther* 123, 54-79. (B) *TRENDS in Biochemical Sciences* (2005) 30(6):325-333

**Figura i6. Diferencias estructurales y de transporte entre GlyT1 y GlyT2.** (A) La estructura de (i) GlyT1 posee tres variantes de “*splicing*” que difieren en su N-terminal (GlyT1a-c) y dos variantes que difieren en su extremo C-terminal (GlyT1d-e) mientras que (ii) GlyT2 sólo posee tres variantes en su extremo N-terminal (GlyT2a-c). Nótese la mayor longitud del extremo amino terminal de GlyT2 que posee unos 200 aminoácidos. (B) Diferencias en el ciclo de transporte de glicina por GlyT1 y GlyT2. Mientras que GlyT1 acopla el transporte de una molécula de glicina al de 2 iones Na<sup>+</sup>, GlyT2 necesita cotransportar 3 iones Na<sup>+</sup>. Este diferente acoplamiento iónico implica que GlyT1 ejerce menor fuerza motriz para el transporte que GlyT2, lo que le permite funcionar en modo reverso dependiendo de los cambios en la concentración extracelular de sustrato o gradientes iónicos. Sin embargo, GlyT2 acumula más glicina en el terminal.

### **2.2.A.- Distribución histológica.**

GlyT1 y GlyT2 presentan diferencias en su función y distribución. GlyT2 se encuentra principalmente en las áreas caudales del SNC, exclusivamente localizado en axones y terminales de neuronas glicinérgicas. GlyT1 tiene una distribución más rostral y se concentra en los astrocitos que circundan las sinapsis tanto glicinérgicas como glutamatérgicas, encontrándose además en tejidos periféricos como el páncreas y el hígado (Jursky and Nelson 1995, Zafra, Aragon et al. 1995a, Zafra, Gomeza et al. 1995b). También se ha encontrado GlyT1 en neuronas glutamatérgicas asociado a receptores de glutamato NMDA (Cubelos, Gimenez et al. 2005a, Cubelos, Gonzalez-Gonzalez et al. 2005b).

### **2.2.B.- Localización celular y tráfico de GlyT2.**

El transportador neuronal de glicina, se ha localizado en vesículas intracelulares (Nunez, Perez-Siles et al. 2009) y su llegada a membrana plasmática se produce por exocitosis mediada por proteínas del complejo SNARE (Geerlings, Lopez-Corcuera et al. 2000). El acceso a la superficie está regulado por modificaciones postraduccionales e interacciones con diversas proteínas. La profusa N-glicosilación del bucle extracelular 2 de los GlyTs es necesaria para la correcta inserción de los transportadores en determinadas zonas de la membrana en células polarizadas (Olivares, Aragon et al. 1995, Martinez-Maza, Poyatos et al. 2001). En las terminaciones presinápticas, la interacción de GlyT2 con syntaxina 1A y con sintenina1 regula la inserción y estabiliza el transportador en membrana (Geerlings, Lopez-Corcuera et al. 2000, Geerlings, Nunez et al. 2001, Ohno, Koroll et al. 2004). GlyT2 se asocia con “microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos” (balsas lipídicas o *lipid rafts*) donde su función es óptima (Nunez, Alonso-Torres et al. 2008). En estos dominios GlyT2 interacciona con distintas proteínas y receptores que regulan su tráfico y su actividad. Un ejemplo es la interacción con la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, proteína que además de mantener el gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> para el correcto funcionamiento de GlyT2, ejerce un papel señalizador que regula su degradación lisosomal (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013b). También interacciona con el intercambiador sodio-calcio (CNX) y con la ATPasa de calcio neuronal de membrana plasmática (PMCA) que se asocian al transportador y proporcionan una correcta homeostasis del calcio y el sodio durante la recaptación del neurotransmisor (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2014).

El extremo N-terminal de GlyT2 interacciona con Ulip6 (Unc-33), proteína para la que se ha propuesto un papel en la activación de la endocitosis de GlyT2 disminuyendo así su presencia en membrana (Horiuchi, Loeblich et al. 2005). Por otro lado, la actividad de la proteína kinasa C

(PKC) es responsable de la ubiquitinación de GlyTs y de otros transportadores como el transportador de glutamato GLT1 o el de dopamina DAT (Miranda, Wu et al. 2005). PKC promueve la ubiquitinación de la lisina K791 de GlyT2, lo que es necesario para la endocitosis constitutiva del transportador (de Juan-Sanz, Zafra et al. 2011). Además, GlyT2 presenta una endocitosis regulada también dependiente de PKC que requiere la ubiquitinación de tres residuos de lisina en su extremo C-terminal (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013a). La localización de GlyT2 en regiones de balsas lipídicas o no es otro mecanismo que regula su actividad (de Juan-Sanz, Zafra et al. 2011).

### **2.2.C.- Regulación de GlyT2.**

Algunos transportadores de la familia SLC6, modifican su actividad en función de la composición de fosfolípidos de membrana (Khelashvili and Weinstein 2015), en función de la concentración de neurotransmisor (Begni, Tremolizzo et al. 2005, Scimemi 2014), o en función de modificaciones postraduccionales como son la fosforilación, la nitrosilación, la glicosilación y otros (Park, Ferrer et al. 2002, Rudnick, Kramer et al. 2014).

Al margen de los ya mencionados mecanismos de control del tráfico y actividad de GlyT2 mediados por PKC, ubiquitinación o localización en balsas lipídicas, GlyT2 es regulado por pequeñas moléculas endógenas tales como etanol (Nunez, Lopez-Corcuera et al. 2000, Harvey and Yee 2013), lípidos endógenos, cannabinoides o derivados como el ácido araquidónico, N-araquidonil-glicina, anandamida, u otros lípidos oleoil-L-carnitina, palmitoil-L-carnitina, estearidonil-L-carnitina, N-oleoil-glycina (Edington, McKinzie et al. 2009, Carland, Handford et al. 2014), pH o zinc (Aubrey, Mitrovic et al. 2000, Ju, Aubrey et al. 2004, Gimenez, Perez-Siles et al. 2012), litio (Perez-Siles, Morreale et al. 2011). Estas moléculas pueden ser generadas por diferentes cascadas de señalización disparadas por la activación de receptores aún por identificar.

Nuestro equipo ha establecido que GlyT2, y diferencialmente GlyT1, son regulados por ATP a través del receptor purinérgico metabotrópico P2Y1 mediante la cascada de señalización NO-GC-PKG, frecuentemente implicada en la plasticidad sináptica asociada a dolor (Schmidtko, Tegeder et al. 2009). La actividad de P2Y1R activa al transportador GlyT1 e inhibe a GlyT2 (Jimenez, Zafra et al. 2011). Esta regulación diferencial se ha interpretado como un mecanismo antinociceptivo por las propiedades que se han atribuido al P2Y1R (Ando, Mehesz et al. 2010) y la implicación de la transmisión glicinérgica en la progresión de la señal nociceptiva (Vandenberg, Ryan et al. 2014).

### **2.2.D.- Fisiopatología de GlyTs: hiperplexia y dolor.**

La actividad de los GlyTs es necesaria para el control de la neurotransmisión glicinérgica así como para un correcto funcionamiento del SNC. La eliminación de los genes de GlyT1 y GlyT2 en ratones reveló importantes aspectos de la función de los transportadores y permitió atribuir a GlyT1 la función de controlar la concentración extracelular de glicina y a GlyT2 la de suministrar glicina a la neurona inhibidora para mantener el contenido cuántico de las vesículas sinápticas (Aragon and Lopez-Corcuera 2005); en los últimos años, se ha demostrado que la actividad de GlyT2 también es determinante para la concentración de glicina en la sinapsis ya que regula tanto la liberación del neurotransmisor en el terminal presináptico como el tiempo que este actúa en la hendidura sináptica (Apostolides and Trussell 2013, Vandenberg, Mostyn et al. 2016).

Los ratones deficientes en GlyT1 (GlyT1<sup>-/-</sup>) sufren alteraciones respiratorias y motosensoriales graves tales como letargia, hipotonía y falta de respuesta a estímulos sensoriales que provocan su muerte a las 6 – 14 horas tras el nacimiento. Estos síntomas son similares a los que se manifiestan en la enfermedad humana conocida como encefalopatía glicinérgica o hiperglicemia no cetósica humana, que cursa con una elevación de la concentración de glicina en el sistema nervioso que inhibe la neurotransmisión en determinadas regiones del SNC (Gomez, Hulsmann et al. 2003a). En la actualidad se han encontrado mutaciones en el gen SLC6A9 (GlyT1 humano) en pacientes de hiperglicemia no cetósica y encefalopatía glicinérgica (Alfadhel, Nashabat et al. 2016, Kurolap, Armbruster et al. 2016). Los ratones heterocigotos GlyT1<sup>+/-</sup> sin embargo, presentan una elevada actividad del receptor NMDA con respecto a otros tipos, en consonancia con un incremento en los niveles de glicina, coagonista del glutamato en receptores NMDA (Tsai, Ralph-Williams et al. 2004). La capacidad de aumentar la concentración de glicina en torno al receptor NMDA, ha sugerido la posibilidad de utilizar inhibidores de GlyT1 en el tratamiento de enfermedades que cursan con hipofunción del receptor NMDA como la esquizofrenia (Javitt 2015).

Los ratones mutantes GlyT2<sup>-/-</sup> presentan síntomas propios de una hipoglicemia tales como una alterada coordinación motora, rigidez muscular, espasticidad temporal, temblores frecuentes y convulsiones, entre otros. Este fenotipo reproduce en gran medida los síntomas de la hiperplexia humana (Gomez, Ohno et al. 2003b). La hiperplexia o enfermedad del sobresalto es un desorden neurológico caracterizado por sobresaltos energéticos y generalizados en respuesta a estímulos triviales acústicos o táctiles asociado con una deficiente neurotransmisión glicinérgica

inhibidora cuya segunda causa principal son mutaciones en el gen humano de GlyT2 (SLC6A5) (Harvey, Carta et al. 2008), aunque la principal causa son mutaciones en el receptor de glicina GlyR.

Diferentes estudios han demostrado que la inhibición farmacológica tanto de GlyT1 como de GlyT2 se asocia con el alivio del dolor neuropático e inflamatorio (Morita, Motoyama et al. 2008, Tanabe, Takasu et al. 2008 2014). La administración intratecal de inhibidores del transportador neuronal (ALX1393 o GT-0198) en modelos de dolor neuropático e inflamatorio tiene un efecto analgésico inmediato y dependiente de la dosis; se ha propuesto que la inhibición de GlyT2 implica una acumulación de la concentración de glicina en el espacio extracelular, lo que fue demostrado en rodajas de médula espinal de rata (Whitehead, Pearce et al. 2004). El efecto analgésico de estos inhibidores, se revierte con el uso de estricnina, un antagonista de los receptores de glicina, lo que demuestra que el efecto está mediado por una elevada cantidad de neurotransmisor glicina en la hendidura sináptica (Haranishi, Hara et al. 2010, Omori, Nakajima et al. 2015, Takahashi, Hara et al. 2015). Estos y otros trabajos sugieren que una potenciación de la neurotransmisión glicinérgica inhibidora en las astas dorsales de la médula espinal, podría ser una estrategia para aliviar el dolor.

### **3. DOLOR.**

#### **3.1.– DOLOR, FIBRAS SENSORIALES Y VÍAS NOCICEPTIVAS.**

El dolor es una experiencia sensorial y emocional (subjetiva) desagradable, asociada a una lesión tisular o expresada como si esta existiera. Existen distintos tipos de dolor que se pueden clasificar como: **1-** dolor fisiológico: tiene una función de protección frente a un daño externo, **2-** dolor patológico: producido por un daño tisular o por inflamación, se caracteriza por la aparición de hiperalgesia (sensibilidad exagerada que aparece en un tejido dañado por un aumento de la respuesta de la fibra sensorial) y/o alodinia (sensación de dolor ante un estímulo indoloro, debida a una reducción del umbral de la fibra sensorial), **3-** dolor neuropático: dolor persistente en ausencia de lesión o inflamación, provocado por un daño en la propia fibra sensorial que tiene un funcionamiento aberrante, esta neuropatía puede ser periférica o central (Schaible and Richter 2004).

Los nociceptores son células que transmiten el componente sensorial discriminativo del dolor (nocicepción) y forman parte tanto del SN somático como del SN autónomo. Los

nociceptores son terminaciones nerviosas libres cuyo cuerpo celular se aloja en los ganglios de las raíces dorsales (DRGs) (Basbaum and Jessell 2000). Estas fibras sensoriales detectan el estímulo, su naturaleza (quemaduras, descargas eléctricas, torsión, etc.), su duración, su evolución, su intensidad y el análisis de sus características espaciales. En función de su diámetro y grado de mielinización, las fibras se clasifican en (Julius and Basbaum 2001): **1-** Fibras A: tipos alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ). De estos subtipos, las fibras A $\delta$  de pequeño diámetro, mielinizadas y de conducción relativamente rápida (5 a 50 m/s) conducen impulsos nociceptivos. **2-** Fibras C (polimodales), no mielinizadas de conducción lenta (existen unas 200 fibras/cm<sup>2</sup> de piel) que pueden ser peptidérgicas o no peptidérgicas. Las fibras peptidérgicas, contienen neuropéptidos como el “péptido relacionado con el gen de la calcitonina” (CGRP) o sustancia P (SP) (Ruscheweyh, Forsthuber et al. 2007), algunas también utilizan somatostatina, encefalina y péptido vasoactivo intestinal. Las fibras no peptidérgicas se caracterizan por la expresión del receptor purinérgico P2X3 (Taylor, Peleshok et al. 2009) y la lectina IB4 (Plenderleith and Snow 1993, Petruska, Streit et al. 1997, Bradbury, Burnstock et al. 1998) y liberan el neurotransmisor glutamato y ATP (Kumar, Cherkas et al. 2012).

Los nociceptores expresan un patrón característico de canales de membrana y de receptores específicos. Así, encontramos canales de sodio dependientes de voltaje tipo 1.7 de bajo umbral, que aumentan la probabilidad de disparo del pA; el tipo 1.8 que conduce la mayor parte de la corriente despolarizante del pA y el tipo 1.9, casi exclusivo de neuronas P2X3, cuya apertura constante amplifica las respuestas subumbrales (Fukuoka, Kobayashi et al. 2008, Fukuoka and Noguchi 2011). Los nociceptores no expresan canales de tipo 1.6. Los canales de calcio expresados en fibras nociceptivas son los tipo L (Cav1.2; participan en el dolor neuropático), los tipo N (Cav2.2: implicados en la liberación de glutamato, SP y CGRP) y los tipo T (Cav3.3: promueven la liberación de glutamato en las astas dorsales). Además, los múltiples subtipos de canales de potasio determinan las características del pA: umbral o amplitud, la duración e incluso la frecuencia de descargas repetitivas (Benarroch 2015). Hay algunos receptores cuya actividad se asocia a la transmisión del dolor como es el caso de los “receptores de potencial transitorio vanilloide” (TRPV) que median la transmisión dolorosa por temperatura elevada y por capsaicina (Caterina, Schumacher et al. 1997, Tamura, Morikawa et al. 2005), o los canales activados por ATP como los receptores P2X3, 4 y 7 (Burnstock 2013). No todos los canales ni los receptores se expresan en todas las fibras nociceptivas.

La activación de una fibra nociceptiva implica la transmisión de un pA que llega a las astas dorsales de la médula espinal, pero también actúa liberando sustancias locales en el tejido

dañado que desencadenan una respuesta en la zona lesionada (inflamación periférica) y actúan sobre la propia fibra. Las sustancias liberadas por estas terminaciones libres (SP, CGRP) provocan vasodilatación y extravasación de mediadores inflamatorios tales como la histamina, prostaglandinas, bradiquinina, y ATP. Estas sustancias producen un cambio de funcionalidad de las fibras nociceptivas disminuyendo su umbral de excitación (Coutaux, Adam et al. 2005). Si la situación persiste, se desencadena una irritación o inflamación nerviosa y aparecen descargas ectópicas patológicas. Durante la inflamación periférica, se liberan en la médula espinal: glutamato, que es el principal neurotransmisor en los nociceptores (Fundytus 2001), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), óxido nítrico (ON), SP, CGRP, neurokinina A, y otras sustancias que favorecen la hiperexcitabilidad en esta región (Schaible and Richter 2004, Stemkowski and Smith 2012).

Algunos de los mediadores que se generan en el proceso proinflamatorio y nociceptivo, tiene un papel dual. Este es el caso de la PGE<sub>2</sub> que desencadena la inflamación y tiene además efectos protectores (Legler, Bruckner et al. 2010, Shi, Johansson et al. 2010), o el ATP que puede actuar sobre receptores que activan vías de dolor (P2X<sub>3</sub>, 4 y 7) o sobre otros receptores antinociceptivos (P2Y<sub>1</sub>) (Ando, Mehesz et al. 2010). También sucede con el ON íntimamente unido a la neurotransmisión glutamatérgica (Contestabile 2000, Esplugues 2002) y que se asocia con analgesia y con dolor (Schmidtko, Tegeder et al. 2009, Zhang, Quock et al. 2011).

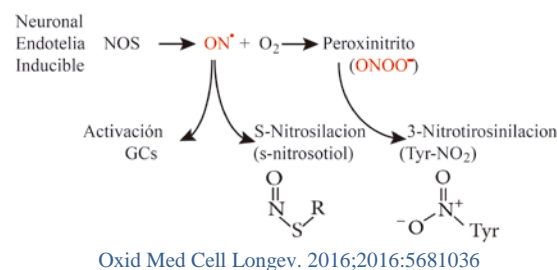
### **3.2.- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO (ON) EN DOLOR.**

El ON es un neurotransmisor no convencional gaseoso que no puede ser acumulado en vesículas, se produce directamente en función de la demanda y actúa a nivel local (Bredt and Snyder 1992, Bredt and Snyder 1994, Vaughn, Kuo et al. 1998). El ON se produce por la actividad de la enzima “óxido nítrico sintasa” (NOS) de la que se conocen tres isoformas: endotelial (eNOS) cuya baja producción de ON parece tener un efecto protector (Li and Poulos 2005); la isoforma inducible (iNOS) activada en procesos inflamatorios donde genera mayor cantidad de ON con un efecto tóxico (Licinio, Prolo et al. 1999); y la isoforma neuronal (nNOS) llamada así porque se identificó en neuronas, pero se expresa en miocitos, pericitos y astrocitos (Yuan, Liu et al. 2004, Wang, Kohr et al. 2008). Puede ser soluble o anclada a la membrana (Hecker, Mulch et al. 1994). Su actividad está relacionada con la ansiedad, la analgesia y con dolor (Cizkova, Lukacova et al. 2002, Tang, Svensson et al. 2007) y colocaliza con el receptor P2Y<sub>1</sub> (Kittner, Franke et al. 2003). En la médula espinal, nNOS se encuentra en el neuropilo de



las láminas I-III y en somas de interneuronas inhibitoras (Valtschanoff, Weinberg et al. 1992, Ruscheweyh, Goralczyk et al. 2006).

Uno de los principales receptores de ON es la “guanilato ciclasa soluble” (GCs) que se localiza en las células satélite de los DRGs, en los pericitos, en neuronas NK1<sup>+</sup> de la lámina I y en las interneuronas inhibitoras de las láminas II y III (figura i3D). La activación de la GCs, conlleva un aumento del GMPc cuya diana principal es la PKG. La PKG se expresa en la mayoría de las terminaciones de las aferencias primarias sensoriales, y en algunas neuronas de las astas dorsales. La PKG modula diversas funciones entre las que destaca la relajación del músculo liso y la función de desagregación plaquetaria (Francis, Busch et al. 2010). La isoforma PKG-II controla el reciclado de vesículas sinápticas (Collado-Alsina, Ramirez-Franco et al. 2014). Además, el ON puede reaccionar directamente con proteínas diana modificando su actividad mediante S-nitrosilación de cisteínas o 3-nitrotirosinilación (o nitración de tirosinas) mediante la formación de peroxinitrito (figura i7). Se han descrito funciones contradictorias de este gas, la señalización del ON depende de distintos factores como su concentración o la presencia de especies reactivas de oxígeno. Así, por ejemplo, puede promover la supervivencia y la muerte celular o tiene efectos tanto pro-nociceptivos (De Alba, Clayton et al. 2006, Guan, Yaster et al. 2007) como analgésicos (Paoloni, Appleyard et al. 2003).



**Figura i7. Vías de generación de ON y modificaciones postraduccionales.** (A) Tras su síntesis por cualquiera de las tres isoformas (neuronal, endotelial o inducible), el ON conduce a la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y a la nitrosilación de grupos tiol de cisteínas formando S-nitrosotioles. La reacción adicional del ON con los radicales de oxígeno conduce a la formación de peroxinitrito y la posterior modificación irreversible de los residuos de tirosina. (B) Existe un equilibrio entre los niveles de ON y la cantidad de modificaciones postraduccionales de las proteínas que determinan un predominio de la señalización asociada a supervivencia o muerte celular.

### 3.3.- PAPEL DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN DOLOR.

La información nociceptiva llega a las astas dorsales de la médula espinal, donde las interneuronas inhibitoras forman complejos circuitos que regulan la neurotransmisión sensorial (Todd 1996, Todd 2010). En la lámina Iii (figura i3D), un 73,2% (SD+/-8,6%) de las sinapsis

procedentes de interneuronas inhibitoras, son de tipo axo-axónico y regulan directamente la propagación o no de los potenciales de acción de las fibras sensoriales aferentes (Hughes, Sikander et al. 2012). Diversos trabajos proponen que el dolor viene acompañado de una disminución de la neurotransmisión inhibitora o “desinhibición” tanto gabaérgica como glicinérgica en las astas dorsales de la médula espinal (Woolf and Mannion 1999, Zeilhofer 2008). En 1994 un estudio del comportamiento de dolor, demostró resultados similares en distintos modelos animales tratados con inhibidores de los receptores de glicina y de GABA (GABA<sub>A</sub>) (Sivilotti and Woolf 1994). Además, se ha demostrado que el uso de estricnina, un antagonista de los receptores de glicina, provoca dolor y alodinia en animales (Yaksh 1989, Sivilotti and Woolf 1994, Sorkin and Puig 1996, Sherman, Luo et al. 1997, Zeilhofer 2008). También se ha descrito una menor neurotransmisión inhibitora en astas dorsales en rodajas de médula espinal en modelos de lesión periférica (Moore, Kohno et al. 2002). Hay resultados contradictorios sobre la reducción del número de neuronas glicinérgicas en las astas dorsales de la médula espinal tras la aparición de un dolor neuropático, los últimos trabajos parecen indicar que no hay un menor número de neuronas glicinérgicas, por lo que han atribuido esta desinhibición a la modificaciones en las propiedades de la membrana, a la disminución de receptores GlyR y cambios en la excitabilidad neuronal (Hermanns, Muth-Selbach et al. 2009) (Coull, Boudreau et al. 2003, Ferrini and De Koninck 2013). La inhibición de GlyR es uno de los mecanismos de acción de la PGE<sub>2</sub> liberada en procesos inflamatorios. PGE<sub>2</sub> a través de su receptor EP<sub>2</sub> provoca la fosforilación de la subunidad  $\alpha 3$  del receptor de glicina (GlyR $\alpha 3$ ) que bloquea su activación disminuyendo la inhibición mediada por este NT (Harvey, Depner et al. 2004, Reinold, Ahmadi et al. 2005). Otras moléculas analgésicas como el endocannabinoide NAGly (Huang, Bisogno et al. 2001), interaccionan directamente con el transportador GlyT<sub>2</sub> inhibiendo su actividad y potenciando la neurotransmisión glicinérgica inhibitora (Edington, McKinzie et al. 2009, Jeong, Vandenberg et al. 2010). Estos resultados atribuyen un efecto analgésico por una mayor concentración de glicina en la hendidura sináptica, y ponen de manifiesto la importancia de la neurotransmisión glicinérgica inhibitora para comprender la señalización nociceptiva.

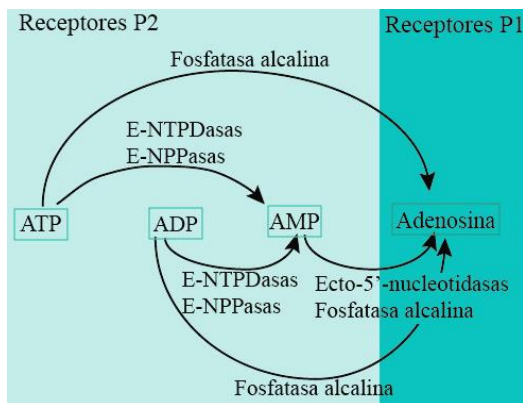
#### **4. EL ATP COMO NEUROTRANSMISOR.**

La primera demostración de que el adenosín trifosfato (ATP) mediaba respuestas extracelulares en el sistema nervioso fue en 1983 cuando mediante técnicas de electrofisiología se registraron corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la

aplicación de ATP (Jahr and Jessell 1983). El mismo resultado se obtuvo en neuronas de ganglios sensoriales (Krishtal, Marchenko et al. 1983). Actualmente está demostrado que el ATP media la transmisión del dolor (Chen, Akopian et al. 1995), las sensaciones propioceptivas (Salter, De Koninck et al. 1993), señales gustativas (Breza and Travers 2016) las corrientes postsinápticas excitadoras en el núcleo de la habénula medial (Edwards, Gibb et al. 1992), en asta dorsal de la médula espinal (Bardoni, Goldstein et al. 1997) y en el hipocampo (Pankratov, Castro et al. 1998). Además, los nucleótidos, pueden actuar como neuromoduladores en la neurotransmisión, ya que son capaces de regular la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA en las terminaciones nerviosas (Gomez-Villafuertes, Gualix et al. 2001, Diaz-Hernandez, Pintor et al. 2002, Gomez-Villafuertes, Pintor et al. 2003, Gualix, Gomez-Villafuertes et al. 2003, Gomez-Villafuertes, Pintor et al. 2004).

#### **4.1.- ALMACENAMIENTO, LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS.**

La molécula de ATP se produce durante la respiración celular, no es capaz de atravesar la membrana plasmática, y en el exterior celular es rápidamente hidrolizada por las ectonucleotidasas. En el sistema nervioso, los nucleótidos se acumulan en vesículas sinápticas y se liberan mediante exocitosis dependiente de calcio (Sawynok, Downie et al. 1993) pudiendo ser liberados junto a otros neurotransmisores (cotransmisión) como la adrenalina, acetilcolina, noradrenalina (Westfall, Shinozuka et al. 1990, von Kugelgen and Starke 1991), glutamato y GABA (Jo and Schlichter 1999, Mori, Heuss et al. 2001, Jo and Role 2002). Tras la exocitosis, la concentración de ATP en la hendidura sináptica alcanza concentraciones de hasta 100 $\mu$ M (Richardson and Brown 1987). El ATP también puede liberarse de modo no exocitótico, por ejemplo, mediante transportadores (Davidson, Dassa et al. 2008), o tras el daño tisular. Las altas concentraciones intracelulares de los nucleótidos (rango mM) hace que sean liberados en grandes cantidades al espacio extracelular tras la ruptura de la membrana plasmática, donde se une a sus distintos tipos de receptores P2 y participa en el proceso inflamatorio y posteriormente, en la recuperación tisular (Bodin and Burnstock 2001). El ATP y nucleótidos son degradados por las ectonucleotidasas (figura i8), que están ampliamente distribuidas en los tejidos, generalmente ancladas a la membrana con su dominio catalítico orientado hacia el exterior celular, aunque también se han descrito formas solubles (Zimmermann 2000, Robson, Sevigny et al. 2006). La degradación secuencial llevada a cabo por estas enzimas inactiva los nucleótidos y da lugar a intermediarios activos como el ADP y generan como último producto el nucleósido adenosina que ejerce sus propias acciones a través de receptores específicos P1, siendo posteriormente recapturada mediante un transportador de alta afinidad (Sen, Delicado et al. 1999).



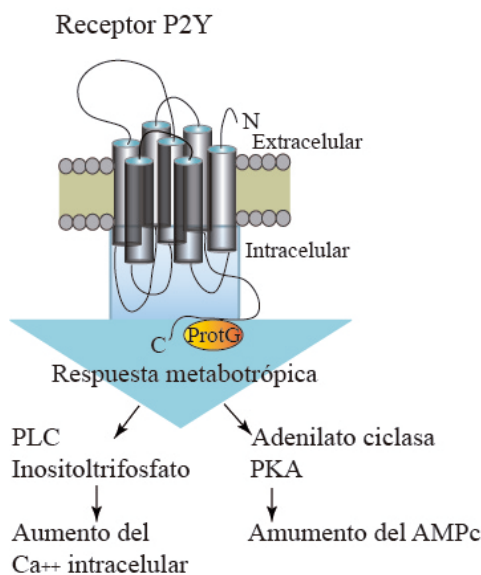
(E-NTPDasas: Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas, E-NPPDasas: Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasas).

**Figura i8. Degradación de los nucleótidos.** En el espacio extracelular el ATP activa a receptores P2. Su acción finaliza por las ectonucleotidasas que degradan los nucleótidos trifosfato y pueden generar diferentes compuestos con acción neurotransmisora como nucleótidos difosfato y adenosina que activa a los receptores P1 y finalmente es transportada al interior celular para la síntesis de nuevos nucleótidos.

#### 4.2.- RECEPTORES DE ATP: RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X.

En el exterior celular, los nucleótidos llevan a cabo sus funciones activando receptores específicos. Estos receptores fueron descritos por primera vez en 1978 por Burnstock, que los clasificó en dos grupos según sus características farmacológicas (Burnstock, 1978).

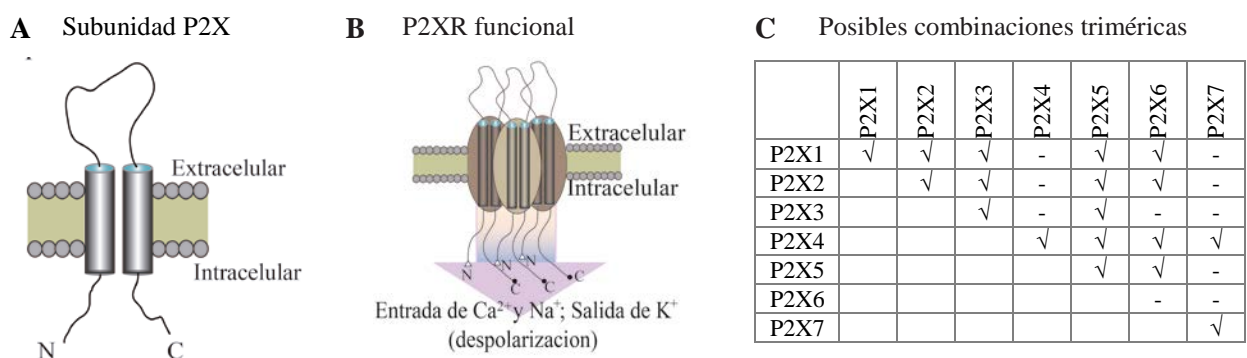
- Receptores P1: o receptores de adenosina, activados por adenosina, antagonizados por metilxantinas y moduladores de la actividad de adenilato ciclasa.
- Receptores P2: activados por ATP y ADP, insensibles a metilxantinas. Este grupo se subdivide en dos familias (Burnstock and Kennedy 1985):



**Figura i9. Estructura del receptor purinérgico metabotrópico P2Y.**

- Los receptores **P2Y** (P2YR) son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio and Burnstock 1994, Ralevic and Burnstock 1998) formados por 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. Su señalización está acoplada a proteínas de membrana, como PLC, adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G (Ralevic and Burnstock 1998, Abbracchio, Boeynaems et al. 2003) (figura i9). Esta familia cuenta con ocho miembros (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14).

- Los receptores ionotrópicos **P2X** (P2XR) son canales iónicos activados por la unión del ATP extracelular que permiten el flujo de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (North 2002). Se han identificado 7 subunidades de receptores P2X diferentes (P2X1 - P2X7) que se ensamblan formando homotrimeros o heterotrimeros (formados por 2 subunidades distintas) para dar lugar a canales funcionales (figura i10) (Nicke, Baumert et al. 1998). Se expresan a lo largo de todo el organismo y median multitud de procesos como la transmisión sináptica o la coagulación sanguínea. La existencia de múltiples variantes de las subunidades, y la posibilidad de formar distintos heterómeros, da lugar a una gran heterogeneidad de respuesta de estos receptores *in vivo* y explica las diferencias existentes entre los receptores endógenos y los expresados *in vitro*.



**Figura i10. Receptor purinérgico ionotrópico.** (A) Estructura general de una subunidad de un receptor purinérgico ionotrópico con los extremos N y C terminales orientados hacia el citosol. (B) Estructura trimérica. Se han identificado 7 tipos de subunidades que oligomerizan en trímeros para formar un canal funcional que permite el paso de cationes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . (C) Posibles combinaciones de subunidades en trímeros P2X (sólo 2 subunidades distintas intervienen en los heterotrimeros) (Torres, Egan et al. 1999, Guo, Masin et al. 2007).

Las distintas subunidades varían entre los 379 aminoácidos de P2X6 y los 595 de P2X7. Cada subunidad consta de dos segmentos transmembrana (TM1 y TM2) entre los que se encuentra un bucle extracelular que podría participar en la unión del ligando. Los segmentos amino y carboxilo terminales están orientados hacia el interior celular. El extremo N-terminal de los receptores purinérgicos, tienen un dominio de unión a PKC (Liu, Brockhausen et al. 2003, Vial, Roberts et al. 2004) (figura i10).

#### 4.2.1.- Receptores purinérgicos y su papel en dolor.

Los indicios de que el ATP podría estar involucrado en nocicepción (Collier, James et al. 1966) se demostraron con el dolor desencadenado por inyecciones de ATP en piel humana (Bleehen and Keele 1977); posteriormente se descubrió la participación del ATP en la migraña

(Burnstock 1981), en las vías del dolor central en la médula espinal (Jahr and Jessell 1983, Salter and Henry 1985) y en procesos inflamatorios periféricos (Bodin and Burnstock 1998). En 1995 fue clonado el receptor P2X3, y se observó que se expresaba fundamentalmente en pequeñas neuronas sensoriales nociceptivas de los DRGs junto con heterotrímeros P2X2/3 (Chen, Akopian et al. 1995, Lewis, Neidhart et al. 1995). Posteriormente se ha descrito que el uso de agonistas y antagonistas de P2X3 en modelos de dolor neuropático e inflamatorio producen hiperalgesia y analgesia respectivamente (Barclay, Patel et al. 2002, Dorn, Patel et al. 2004, Chen, Li et al. 2005) (Jarvis, Burgard et al. 2002, Sharp, Reeve et al. 2006). Se han obtenido efectos similares mediante silenciamiento génico de P2X2 y de P2X3 (Souslova, Cesare et al. 2000, Cockayne, Dunn et al. 2005), silenciamiento con RNAi (Dorn, Patel et al. 2004) y oligonucleótidos antisentido (Barclay, Patel et al. 2002, Honore, Kage et al. 2002). Además, se ha descrito un aumento de la expresión del receptor en neuronas sensoriales ante lesiones de origen oncológico (Wu, Yuan et al. 2016), o nervioso (Novakovic, Kassotakis et al. 1999), lo que se ha interpretado como un mecanismo necesario para la aparición del dolor neuropático.

Otros receptores purinérgicos, también ejercen un importante papel en dolor. El receptor P2X7 se expresa junto con P2X1 y P2X4 en una gran variedad de células del sistema inmune y microglía (Burnstock and Knight 2004) participando en la inflamación mediante la liberación de IL-1 $\beta$  (Ferrari, Pizzirani et al. 2006). La inhibición de P2X7 tiene un efecto antineuropático (Donnelly-Roberts and Jarvis 2007), lo que se ha demostrado tanto en animales *knockout* (Chessell, Hatcher et al. 2005) como con el uso de antagonistas específicos (Honore, Donnelly-Roberts et al. 2006, McGaraughty, Chu et al. 2007). Además, la subunidad P2X4 provoca la liberación de PGE2 que también participa en el proceso inflamatorio (Ulmann, Hirbec et al. 2010). Se ha demostrado que el uso de oligonucleótidos antisentido para P2X4, confiere protección contra el dolor neuropático (Tsuda, Shigemoto-Mogami et al. 2003, Inoue, Tsuda et al. 2004). Finalmente, el uso de antagonistas del receptor purinérgico metabotrópico P2Y12 previene la aparición de alodinia tras la lesión periférica (Kobayashi, Yamanaka et al. 2008, Tozaki-Saitoh, Tsuda et al. 2008).

Por otro lado, la actividad de algunos de los receptores purinérgicos tiene un función analgésica, de tal forma que la administración intratecal de UDP (uridine-5'-diphosphate), UTP (uridine-5'-triphosphate) y de agonistas de receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 tienen efectos analgésicos (Okada, Nakagawa et al. 2002). En DRG y en astas dorsales de la médula espinal la activación de los receptores P2Y1 induce analgesia en modelos de dolor agudo, dolor neuropático y en menor medida en dolor inflamatorio (Heinrich, Kittel et al. 2008, Kobayashi,



Yamanaka et al. 2008, Ando, Mehesz et al. 2010). El efecto analgésico de P2Y1 se debe, en parte, a su capacidad de inhibir canales de calcio dependientes de voltaje tipo N (Gerevich and Illes 2004).

#### **4.2.2- Distribución histológica y funciones de los receptores purinérgicos P2X(1-3).**

Los receptores P2X están ampliamente distribuidos por todo el organismo en multitud de tejidos, son especialmente abundantes en tejidos excitables como el músculo liso y el tejido nervioso donde se expresan tanto en neuronas como en glía (Rubio and Soto 2001, North 2002). También se encuentran en células del sistema inmune, plaquetas, endotelio vascular, epitelio respiratorio, y tejidos endocrinos (Ralevic and Burnstock 1998, Surprenant and North 2009).

En este trabajo, hemos analizado los efectos que los receptores P2X1, P2X2, P2X2/3 y P2X3 tienen sobre la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria, por lo que solo vamos a describir las características de estas subunidades.

- El receptor P2X1 fue el primero en ser clonado y se expresa en plaquetas, en músculo liso, sistema vascular y corazón (Hansen, Bennett et al. 1999, Vial and Evans 2002a). Participa en la agregación plaquetaria (Rolf, Brearley et al. 2001), en la contracción vascular (Mulryan, Gitterman et al. 2000) y la autorregulación renal (Surprenant and North 2009) e interviene en la fisiopatología cardiovascular (Burnstock 2017). En el sistema nervioso, P2X1 aparece como homómero, como heterómero con P2X5 en corteza cerebral de ratón (Lalo, Pankratov et al. 2008) y con P2X2 en neuronas del ganglio cervical (Calvert and Evans 2004). Se ha descrito la presencia de este receptor en terminaciones presinápticas en el núcleo del tracto solitario, donde es responsable, junto a otros P2X, de modular la liberación de glutamato (Shigetomi and Kato 2004).

- En sistema nervioso, P2X2 regula la liberación presináptica de glutamato en hipocampo (Khakh, Gittermann et al. 2003) y está involucrado en la despolarización y la liberación hormonal en la pituitaria junto con P2X4 (Zemkova, Yan et al. 2007). Además, regula la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo (Rong, Gourine et al. 2003). Este receptor se encuentra también en la retina, en músculo liso en células cromafines y en ganglios autónomos y sensoriales (Burnstock 2007) donde participa en la señalización somatosensorial (Cockayne, Dunn et al. 2005).

- El heterómero P2X2/3 se expresa en varios tejidos. Está involucrado en la transducción de la señal mecanosensorial del gusto (Roper 2007, Breza and Travers 2016) y en las vías

aferentes auditivas (Munoz, Thorne et al. 1999, Housley, Jagger et al. 2002). Participa también en la regulación de la motilidad intestinal (Bian, Ren et al. 2003, Ren, Bian et al. 2003) y en la transducción de la señal nociceptiva en médula espinal.

- El receptor P2X3 se expresa en retina, en sistema auditivo y gustativo, núcleo del tracto solitario, ganglio trigémino (Llewellyn-Smith and Burnstock 1998), ganglio nodoso (Ruan and Burnstock 2003) y es especialmente abundante, en coexpresión con P2X2, en neuronas sensoriales (Llewellyn-Smith and Burnstock 1998, Kobayashi, Fukuoka et al. 2005) donde su función es fundamental en la percepción del dolor. Por ejemplo, la distensión de la vejiga urinaria produce la liberación de ATP que activa el receptor P2X3 situado en las vías aferentes presentes en la vejiga, desencadenando la sensación de dolor (Ferguson, Kennedy et al. 1997, Cockayne, Hamilton et al. 2000). También se ha encontrado relación entre la actividad de P2X3 y el dolor en cáncer de huesos (Wu, Yuan et al. 2016) y multitud de trabajos han demostrado el papel de este receptor, solo o en combinación con P2X2, en la percepción del dolor neuropático e inflamatorio (Wirkner, Sperlagh et al. 2007, Burnstock 2013).

#### **4.2.3.- Farmacología de P2X1, P2X2 y P2X3.**

En general pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los P2XR. Por una parte se encuentra el grupo formado por P2X1 y P2X3, que se caracterizan por presentar una cinética de desensibilización rápida (Rettinger and Schmalzing 2003). Estas subunidades presentan una gran afinidad por el ATP ( $EC_{50} \sim 0,1 \mu M$ , P2X1, 3). El otro grupo engloba al resto de receptores, P2X2, 4, 5, 6 y 7, que presentan una cinética de sensibilización lenta y una  $EC_{50}$  más elevada para el ATP ( $EC_{50} = 10 \mu M$ , P2X2, 4,6;  $EC_{50} = 400 \mu M$ , P2X7) (Khakh, Burnstock et al. 2001, North 2002). Las características farmacológicas de estos receptores, vienen determinadas por las subunidades que lo forman.

Las herramientas farmacológicas disponibles para discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos limitadas. Existen agonistas y antagonistas que, a una misma concentración, pueden actuar tanto sobre P2XR como P2YR. Además, es importante destacar que la afinidad de los receptores por los diferentes agonistas o antagonistas puede variar entre las distintas especies (Young, Pelegrin et al. 2007).

- Los receptores homoméricos P2X1 se activan por ATP,  $\alpha\beta$ -meATP (Valera, Hussy et al. 1994),  $\beta\gamma$ -meATP (Garcia-Guzman, Stuhmer et al.) y también por BzATP (Evans, Lewis et al. 1995, Bianchi, Lynch et al. 1999). Y son bloqueados por suramina (Evans, Lewis et al. 1995),



sin embargo, la mayoría de las restantes subunidades P2X, así como algún receptor P2Y, también es bloqueado por este antagonista. Los compuestos trinitrofenol-derivados, como el 2',3-O-(2',4',6')-trinitrofenil- ATP (TNP-ATP), antagonizan el efecto de P2X1, pero al igual que la suramina y el PPADS, también inhibe a varias de las subunidades P2X. Sin embargo, el TNP-ATP es unas 1000 veces más potente sobre los receptores P2X1, P2X3 y P2X2/3 ( $IC_{50} = 0.3 - 1nM$ ) que sobre el resto de los P2XR, lo que puede servir para su discriminación (Thomas, Virginio et al. 1998, Virginio, Robertson et al. 1998). Los receptores P2X1 sufren una rápida desensibilización y la recuperación del canal es extremadamente lenta (North 2002).

- Receptores homoméricos P2X2: no se conoce farmacología específica para este receptor, se activan por ATP y por 2MeSATP (King, Wildman et al. 1997, Morton-Jones, Vljakovic et al. 2015, Pollatzek, Hitzel et al. 2016) y son insensibles a la acción del  $\alpha\beta$ -meATP. El Brilliant Blue G (BBG), PPADS y TNT-ATP son bloqueantes no selectivos de este receptor (Evans, Lewis et al. 1995, Jiang, Mackenzie et al. 2000). La desensibilización de P2X2 es lenta (Morton-Jones, Vljakovic et al. 2015).

- Receptores homoméricos P2X3: la gran afinidad del receptor P2X3 por el ATP, el  $\alpha\beta$ -meATP y el  $\beta\gamma$ -meATP hacen que esta subunidad sea difícil de diferenciar del P2X1 (Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997). Es antagonizado por suramina, TNT-ATP y posteriormente se han desarrollado antagonistas más selectivos como el A3174991 (Jarvis, Burgard et al. 2002) o el AF353 (Gever, Soto et al. 2010). P2X3 sufre una rápida desensibilización en presencia de ATP. La recuperación es también muy lenta, aunque puede acelerarse si el medio contiene iones  $Ca^{2+}$  (Lewis, Neidhart et al. 1995) y por temperatura superior a 29°C (Pryazhnikov, Fayuk et al. 2011).

- Receptor P2X2/3: este heterotrímero se compone de dos subunidades de P2X3 y una de P2X2 (Jiang, Kim et al. 2003) y muestra características farmacológicas intermedias de ambas subunidades, por lo que puede activarse por  $\alpha\beta$ -meATP como el P2X3, es antagonizado por TNP-ATP y muestra una cinética de desensibilización lenta como el P2X2.

El heterotrímero P2X1/2 únicamente ha sido descrito en sistemas de sobreexpresión heteróloga en oocitos de *Xenopus*, donde se ha demostrado que pueden coensamblar y formar un receptor funcional que responde a ATP (Brown, Townsend-Nicholson et al. 2002, Aschrafi, Sadtler et al. 2004).

A pesar de los avances en la farmacología de los receptores purinérgicos, la identificación de las distintas subunidades no resulta sencilla ya que la mayoría de los estudios se han realizado en sistemas de expresión heteróloga, sin tener en cuenta la situación real *in vivo* donde se expresan varios tipos de receptores que pueden interactuar entre sí, ni la acción de las enzimas ectonucleotidasas y nucleotidasas solubles presentes en la superficie celular o liberadas al medio, que pueden degradar o transformar los agonistas y antagonistas utilizados.

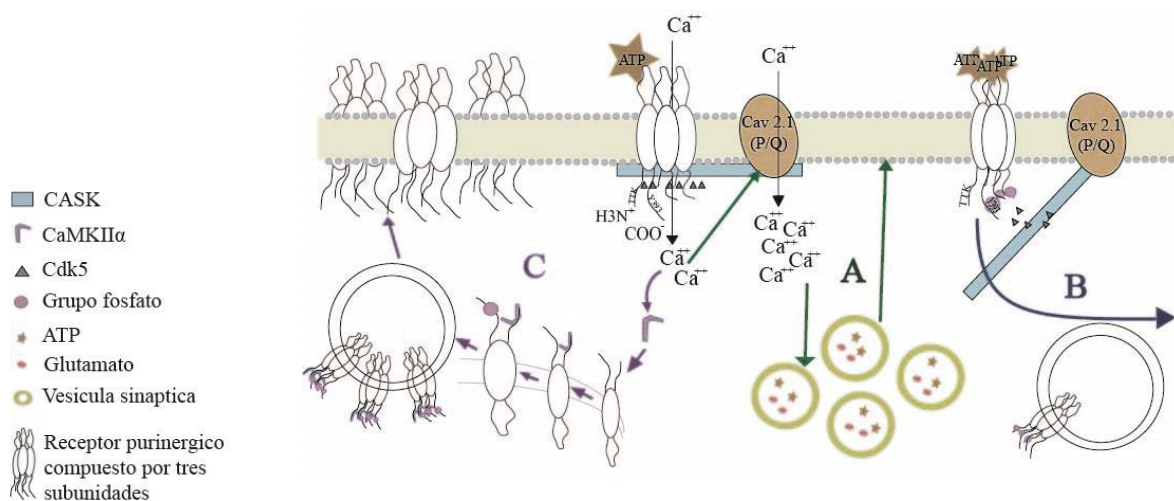
Ante las dificultades de diferenciar farmacológicamente estas tres subunidades, se han investigado herramientas complementarias para poder diferenciarlas; estas herramientas consisten principalmente en el uso combinado de neuroesteroides que regulan la actividad de las distintas subunidades de manera específica, como es el caso de la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la progesterona (PRO). La DHEA es un neuroesteroide secretado por las glándulas suprarrenales (precursor de andrógenos y estrógenos) y, dentro del sistema nervioso, es sintetizada por las neuronas y la glía (Friess, Schiffelholz et al. 2000). La progesterona es una hormona esteroidea implicada en la menstruación, el embarazo y la embriogénesis; se sintetiza en las glándulas suprarrenales, en el ovario y, durante el embarazo, también en la placenta. Se ha demostrado que estas hormonas modulan las corrientes de calcio generadas por la activación de los receptores homoméricos P2X2 o heteroméricos P2X2/3. Concretamente, se ha descrito que la DHEA reduce las corrientes de los homómeros de P2X3 de forma dosis dependiente (Liu, Hsieh et al. 2001), y potencia las corrientes de los heterómeros P2X2/3 (De Roo, Rodeau et al. 2003). La progesterona potencia exclusivamente aquellas corrientes de calcio originadas por la activación de homómero P2X2 (De Roo, Boue-Grabot et al. 2010).

#### **4.2.4.- Señalización y modulación de los receptores P2X3 y P2X2/3.**

No se conocen todos los mecanismos moleculares que suceden con la activación de una neurona sensorial ante un estímulo doloroso. De lo descrito hasta la fecha, se sabe que la activación del receptor P2X3 en la fibra sensorial implica la endocitosis y transporte del mismo hasta el soma de la neurona (Chen, Wang et al. 2012) (figura i11), en este mecanismo de endocitosis, se produce la fosforilación del receptor en un residuo de serina por acción de la serin-kinasa de membrana dependiente de calcio – calmodulina (CASK) (Gnanasekaran, Sundukova et al. 2013a), y su endocitosis y transporte esta mediado por una cascada enzimática que implica a: PKC → Ras → MEK → ERK y Rab7. Finalmente, esto implica la fosforilación del factor CREB y la activación de la expresión de genes bajo el promotor de respuesta a AMPc. Esta ruta se activa rápidamente, detectándose la llegada del receptor P2X3 al núcleo de la

neurona sensorial ya a los 5 minutos de la unión del agonista al receptor purinérgico (Chen, Wang et al. 2012).

Por otro lado, la unión del ATP al receptor P2X3 conlleva la entrada de calcio y la activación de la proteína quinasa II $\alpha$  dependiente de calcio – calmodulina (CaMKII $\alpha$ ) (Xu and Huang 2004, Chen, Zhu et al. 2014) que se une al extremo N-terminal del P2X3 intracelular localizado en el retículo endoplásmico (Murrell-Lagnado and Qureshi 2008). Esta unión conduce a una fosforilación en el extremo C-terminal del receptor lo que conlleva su integración en balsas lipídicas de membrana, aumentando así la cantidad en superficie a pesar de su endocitosis (Chen, Zhu et al. 2014). La CASK se localiza en la región de balsas lipídicas asociada a P2X3 estabilizando la posición de este en la membrana (Gnanasekaran, Sundukova et al. 2013a). P2X3 también interacciona con proteínas como caveolina 1a y con los canales de calcio 2.1 (tipo P/Q) (Gnanasekaran, Bele et al. 2013b). La entrada de calcio a través del receptor, puede activar localmente a estos canales, este cambio de potencial de membrana en una región concreta, lleva a la fusión de vesículas sinápticas (Tarr, Dittrich et al. 2013) que en el caso de fibras C no peptidérgicas contienen Glutamato y ATP (Kumar, Cherkas et al. 2012).



**Figura i11. Ensamblaje del receptor P2X2/3 – P2X3 en la membrana neuronal. Esquema de los mecanismos desencadenados tras la activación de P2X3 por ATP.** Los receptores P2X3 –P2X2/3 se localizan en balsas lipídicas asociados a la CASK junto a canales de Calcio P/Q. (A) La entrada de calcio a través de P2X3 activa localmente a estos y otros canales amplificando la señal; el cambio de potencial de membrana en una región concreta desencadena la fusión de vesículas sinápticas (glutamato y ATP). (B) La activación del receptor P2X3 conlleva su desensamblaje de la membrana y la internalización y transporte retrogrado del receptor en endosomas que van al soma para regular la función génica neuronal en un proceso mediado por MAPK. (C) La entrada de calcio activa a

CaMKII $\alpha$ ; esta kinasa se une al extremo N terminal de los receptores P2X intracelulares del retículo endoplásmico, y fosforila el extremo C terminal de P2X3 que a continuación, se ensamblan en forma de trímeros y se integra en balsas lipídicas aumentando así la cantidad de receptor en membrana a pesar de su endocitosis.

Los receptores purinérgicos, interactúan con receptores, proteínas y moléculas de su entorno que pueden potenciar, inhibir o modificar los efectos del mismo. Un ejemplo es la interacción negativa de los receptores nicotínicos con los P2X en el sistema entérico (Barajas-Lopez, Espinosa-Luna et al. 1998) y de los receptores de serotonina con P2X3 (Barajas-Lopez, Montano et al. 2002), que en ambos casos se inhiben mutuamente. También se ha descrito una interacción entre rho1/GABA con el receptor P2X2 a través del extremo C-terminal de este último, y al igual que ocurre con los receptores nicotínicos y de serotonina, la activación de uno de estos receptores induce la inhibición del otro y viceversa (Boue-Grabot, Toulme et al. 2004). Además, la actividad de P2Y1 inhibe a los receptores P2X3 en DRGs (Gerevich, Muller et al. 2005), y en hipocampo, donde la activación de P2Y1 disminuye la liberación de glutamato mientras el receptor P2X3 ejerce el efecto contrario (Rodrigues, Almeida et al. 2005). Cabe destacar que la mayoría de las fibras sensoriales tipo C no peptidérgicas coexpresan ambos receptores (Ruan and Burnstock 2003).

Otras sustancias como el NGF (D'Arco, Giniatullin et al. 2007), la PGE2 (Wang, Li et al. 2007a, Wang, Gu et al. 2007b), la IL-1 $\beta$  (Noma, Shinoda et al. 2013, Schiavuzzo, Teixeira et al. 2015), SP o la bradikinina (Paukert, Osteroth et al. 2001), potencian las corrientes de calcio del canal P2X3. La composición de fosfolípidos de membrana regulan la funcionalidad de receptor P2X2 y P2X3 (Mo, Bernier et al. 2009). También la presencia de cationes divalentes y una gran variedad de metales como el cobre o el zinc son capaces de modular alostéricamente los P2XR (Brown, Townsend-Nicholson et al. 2002). Por último, las fosforilaciones y defosforilaciones llevadas a cabo por quinasas y fosfatasa pueden regular a estos receptores, como por ejemplo, la PKA, que inhibe el P2X2 (Chow and Wang 1998), la CaMKII que potencia la respuesta a ATP aumentando el tráfico de receptores (Xu and Huang 2004), la propia PKC que fosforila residuos de treonina regulando la desensibilización de los receptores P2X1 y el P2X2 (Boue-Grabot, Archambault et al. 2000, Toth-Zsomboki, Oury et al. 2002), además de potenciar la respuesta de P2X3, mientras que las quinasas CSK Y Cdk5 disminuyen las corrientes de calcio de P2X3 (D'Arco, Giniatullin et al. 2007, D'Arco, Giniatullin et al. 2009, Nair, Simonetti et al. 2010).

Los receptores de nucleótidos, como sucede a la mayoría de los receptores, no pueden ser analizados en solitario, sino dentro del contexto del microambiente donde están situados, teniendo en cuenta las interacciones que poseen con otras proteínas, lo que contribuye a la heterogeneidad de respuestas encontradas entre los distintos tipos celulares (Volonte and D'Ambrosi 2009).



## **OBJETIVOS**





El transportador neuronal de glicina de alta afinidad GlyT2 está localizado en la membrana presináptica de neuronas modulando y la concentración de glicina en la presinapsis y en la hendidura sináptica. GlyT2 es esencial en el procesamiento de la información sensorial y participa en el establecimiento del dolor neuropático. En nuestro laboratorio, un trabajo previo demostró que GlyT2 se regula negativamente por receptores purinérgicos P2Y1, que se expresan en neuronas sensoriales y se les atribuye un papel antinociceptivo. Este trabajo ha sido dirigido a establecer si otros receptores de ATP presentes en vías nociceptivas modulan a GlyT2. El receptor P2X3 y el heterómero P2X2/3 son receptores asociados a la transmisión de la señal dolorosa, aunque su farmacología no es fácilmente distinguible de la de otros receptores como P2X1. Por estas razones, los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- 1- Conocer la respuesta del transportador neuronal GlyT2 ante estímulos nociceptivos y ante la estimulación de receptores pronociceptivos P2X.
- 2- Seleccionar herramientas farmacológicas válidas para estudiar la modulación de GlyT2 por receptores P2X.
- 3- Estudiar en detalle la regulación de GlyT2 por receptores P2X3.
- 4- Identificar la ruta de señalización que conduce a la modulación de GlyT2 por el receptor P2X3.
- 5- Explorar la repercusión de la regulación estudiada sobre la neurotransmisión glicinérgica.



## **MATERIAL Y MÉTODOS.**



## **1. CULTIVOS CELULARES.**

**Cultivo primario de neuronas de tallo cerebral y Médula espinal (Rata E16):** Las ratas Wistar de 16 días de gestación se sacrifican por dislocación cervical tras exposición a atmósfera de CO<sub>2</sub>. Se extraen los fetos y se diseccionan en HBSS para extraerles la médula espinal y los ganglios de las raíces dorsales (DRGs). El tejido se trata con tripsina durante 15 minutos y a continuación se disgrega con pipeta de cristal. Las células se centrifugan durante cinco minutos a 1200 rpm y el precipitado se resuspende en el medio de siembra (50ml NB de Invitrogen, 1ml B27 de Invitrogen, 120µl de glutamina 200mM, 50µl de una mezcla de estreptomocina 10% y penicilina G105 U/ml). Las células se plaquean a una densidad de 75000 células/cm<sup>2</sup> en placas previamente tratadas con poli-D-lisina 1 µg/mL (Sigma, USA) durante una noche. A las 48 horas tras la siembra, se retira el medio por completo y se sustituye por medio fresco con AraC 1µM (arabinofuranosil citidina). Los cultivos se mantienen a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 a 18 días, añadiendo medio fresco una o dos veces según fuera necesario.

**Cultivo de líneas celulares COS7 y 1321N1:** La línea celular COS-7 (*American Type Culture Collection*) proviene de fibroblastos de riñón de mono verde africano, resultó de la transformación de la línea CV-1 con un virus defectivo de SV40, dando lugar a la línea celular que expresa constitutivamente el antígeno T. La línea celular 1321N1 procedente de astrocitoma humano, resultó de un sub-clon de la línea 1181N1 aislado en 1972 de la línea tumoral parental U-118 (Macintyre, Ponten et al. 1972). Ambas líneas celulares se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (D10) y se mantenían a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS.**

**Células 1321N1 - transfección con lipofectamina (*Thermo Science*):** Las células 1321N1 se siembran al 50% en placas con PLL un día antes de la transfección. A las 24 horas, se les cambia el medio de crecimiento por DMEM y en este medio se añade la mezcla de ADN y lípidos en una relación 1:3 (µg/µL) en DMEM durante 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se cambia el medio de transfección por el medio de crecimiento (D10). A las 24 horas, las células se pasan al soporte necesario para realizar el experimento (placas multi-pocillo o cubres de cristal recubiertos con PLL).

**Células COS7 - transfección con TurboFect (*Thermo Science*):** Para la transfección de células COS7, se realiza un pase de las células a una dilución 1/3 para transfectar a las

24h con una confluencia del 80%. La transfección se lleva a cabo en el medio de crecimiento (sin antibióticos), sobre el que se añade la mezcla de ADN + lípido en una relación 1:2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en DMEM. Se deja el medio de transfección al menos 6 horas y hasta 24 horas. Posteriormente, las células se pasan al soporte necesario y se realiza el experimento a las 48 horas post-transfección.

**Células HEK293T** - transfección con TurboFect (*Thermo Science*): Se ha realizado transfección en células HEK293T para la producción de partículas lentivirales. Se siembran las células a una confluencia de  $3 \times 10^6$  células / P100 el día antes de realizar la transfección con el shRNAi y las particular virales de empaquetamiento. La transfección se lleva a cabo en OptiMEM, sobre el que se añade la mezcla de ADN\* con el lípido TurboFect en una relación 1:2 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) preparado también en OptiMEM. El medio de transfección se deja al menos durante 6 horas. Posteriormente, se cambia por medio de crecimiento (D10) durante 24 horas. Por último, se añade el medio de recogida de partículas lentivirales (Neurobasal) y se incuba 24 horas antes de su recolección para ser filtrado, alicuoteado y congelado a  $-80^\circ\text{C}$ .

\*:  $8\mu\text{g}/\text{P100}$  de shRNAi de la secuencia de interés introducida en el vector pLVTHM (*addgene Plasmid 12247: pLVTHM*) +  $4\mu\text{g}/\text{P100}$  de plásmido de empaquetamiento pCMVdR8.74 (*addgene*) +  $4\mu\text{g}/\text{P100}$  de plásmido pseudotipado de la proteína G: pMDG2 (*addgene Plasmid 12259: pMD2.G*).

**shRNAi:** se encargaron secuencias de 75 oligonucleótidos a Sigma con la secuencia para:

P2X3i: 5'-CGCGTCCCC TTCTGAGAAAAGCAGTGTTCCTTCAAGAGAGGGAAACACTGCTTTTCTCAGAA TTTTGGAAAT-3';

P2X2i: 5'-CGCGTCCCC TGGAActTCTGACAACCATTTCTTCAAGAGAGAAAATGGTTGTCAGAAGTTCCA TTTTGGAAAT-3'

Las secuencias se introdujeron en el plásmido lentiviral pLVTHM (cedido por Francisco Zafra) mediante digestión en dos pasos con enzimas de restricción ClaI (*New England BioLabs*) y Mlu (*Thermo Scientific*), ligación (*Roche*), y se transformaron en bacterias E-coli tipo SURE 2 según el protocolo de la casa comercial de esta cepa (*Supercompetent Cells Stratagene*); se crecieron en 100mL en un matraz Erlenmeyer durante 18 horas y se purificó el ADN bacteriano siguiendo el protocolo Kit-Midi (*Genomed*); el ADN fue cuantificado y almacenado en alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### **3. INFECCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS.**

Los cultivos neuronales son infectados a las 24 horas de sembrarse y se mantienen en cultivo durante 16 días. La infección se comprueba inmediatamente antes de realizar el

experimento observando la expresión de GFP mediante microscopio de epifluorescencia invertido Leica DMIRB.

#### **4. ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).**

Cantidades idénticas de proteínas (cuantificadas mediante el método de Bradford) se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5% acrilamida y 0,2% de bisacrilamida) y SDS al 10% en condiciones reductoras. Las muestras cargadas en minigeles (Sistema de electroforesis MiniProtean3, *BioRad*) se someten durante 2h a una corriente constante de 30mA en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25mM pH 7,5, glicina 192mM, SDS al 0,1%). Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de Immobilon-P (*Millipore*) previamente incubada en metanol, o una membrana de nitrocelulosa (varía según el anticuerpo que se vaya a utilizar), mediante un sistema de electrotransferencia semi-seca (*Life-Technologies*) a 1,2 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 hora en un tampón que contiene metanol al 20% y Tris-HCl 100mM pH 7,4. La unión inespecífica de proteínas se elimina incubando los filtros con tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en tampón fosfato salino PBS: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM) durante 1hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incuban 1h a temperatura ambiente, o toda una noche a 4°C con anticuerpo primario de unión específica a la proteína de interés. Se retira el anticuerpo y se lavan las membranas varias veces e incuban con el anticuerpo secundario anti-IgG – específico de especie unido a peroxidasa. Las proteínas unidas los anticuerpos se visualizan con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (*Bio Rad*), las exposiciones se realizan en placas de autorradiografía (*Afga Curix RP2 Plus*) y se analizan densitométricamente (Escáner BioRad GS800) con los programas “Quantity One” de BioRad y con “ImageJ”) (y con Escáner BioRad GS900. Programa “Image Lab Software 5.2”).

#### **5. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS.**

Las ratas adultas se anestesian con pentobarbital; tras la desaparición de reflejo ocular y de la cola, se inmoviliza al animal en posición de cúbito supino y se abre el tórax para insertar la cánula de perfusión en ventrículo derecho alcanzado la aorta para la perfusión con 500ml suero salino seguido de 350ml de paraformaldehido (PFA) 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 (PB 0,1M: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,019M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,081M). Se extrae el tejido medular y se corta en vibratomo a un grosor de 40µM. Las secciones se montan húmedas sobre portaobjetos tratados con una sustancia adherente y se dejan secar.

## **6. INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Los portaobjetos con las secciones de tejido se dejan secar a temperatura ambiente (45 min). Se hacen tres lavados con PB 0,1M – pH 7,4 (10 min) y un pretratamiento con metanol al 10% en PB (20 min); después se hace dos lavados con PB 0,1M pH 7,4 y uno con PBS (5-10 min). Se colocan los portaobjetos en horizontal en una caja cerrada herméticamente y se añade la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (solución de bloqueo: Tritón X-100 0,3%, FBS 5%, albumina (BSA) 2%, gelatina 0,2% en PBS). Después, se retira la solución de bloqueo y añadimos el anticuerpo primario (preparado en 10% de solución de bloqueo en PBS) que se incuba durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario. El exceso de anticuerpo primario se lava con PBS tres veces en agitación (10 min). Volvemos a colocar los portaobjetos en cámara horizontal e incubamos con anticuerpo secundario preparado en 10% de solución de bloqueo en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente lavamos tres veces con PBS en agitación (15 min) y colocamos sobre la muestra un cubreobjetos que fijamos con mowiol-dabco. Se deja secar durante 24-48 horas antes de la toma de imágenes.

## **7. EXPERIMENTOS DE MICROFLUORIMETRÍA DE CALCIO**

Las células se siembran en cubres de 12 mm de diámetro recubiertos con PLL. En caso de las células de línea transfectadas el experimento se realiza 40 horas post-transfección; en el caso de cultivos primarios, el experimento se realiza a los 16 DIV.

Los cubres con las células se lavan durante 10 min en solución salina-HEPES (HCSS) con 1mM de calcio y 5mM de glucosa (NaCl 120mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8mM, HEPES 25mM, KCl 5,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM) a continuación se incuban durante 40 min con solución de carga con la sonda fluorescente Fura-2AM (HCSS sin calcio, glucosa 5mM y Fura-2AM 5µg/mL). Antes de acoplar el cubre con las células cargadas en el microscopio de registro, es necesario lavar el exceso de sonda con HCSS con calcio durante al menos 20 min en neuronas; en células 1321N1 el lavado debe ser de entre 5 y 10 min, y no exceder nunca de 15 min. En la cámara de registro donde se añaden los fármacos, se utiliza HCSS 1mM de calcio 5mM de glucosa y sin HEPES.

## **8. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA.**

Las células sembradas sobre cubres se lavan con PBS a 37°C (2 min), posteriormente se fijan con metanol frío (-20°C) en agitación a 4°C (5 min). Se detiene la fijación con un lavado con glicina 0,1M en PBS a temperatura ambiente (5 min), seguido de otro lavado con PBS. Después se permeabilizan las células con TritonX-100 al 0,25% en PBS durante (5 min) y se



lava dos veces con PBS. A continuación, ponemos los cubres en solución de bloqueo durante 1 hora (solución de bloqueo: FBS 2%, albumina (BSA) 2%, gelatina 0,2% en PBS). Se retira la solución de bloqueo y se añade una gota sobre el cubre con el anticuerpo primario de interés en PBS 10% de solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (todos los anticuerpos para receptores purinérgicos se dejaron durante toda la noche). Después de lavar tres veces (5 min) con PBS, añadimos el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con anticuerpo secundario hacen tres lavados (10 min) y se monta el cubre sobre un portaobjetos con mowiol-dabco.

## **9. ANTICUERPOS.**

Proteína que reconocen	Especie	Membrana	Dilución	Casa comercial.
P2X1	Rb	Nitrocelulosa	1/100	Allomone
P2X2	Rb	Nitrocelulosa	1/200	Allomone Labs
P2X3	Rb	Nitrocelulosa	1/100 y 1/50	Allomone Labs/
P2X3	Goat	PVDF	1/50	Santa Cruz
P2X4	Rb	Nitrocelulosa	1/10	Allomone Labs
P2X6	Rb	Nitrocelulosa	1/10	Allomone Labs
P2X7	Rb	Nitrocelulosa	1/10	Allomone Labs
GlyT2	Rat / Rb	Nitrocelulosa	1/2000	Propios
Ubiquitina P4D1	Ms	Nitrocelulosa	1/10	Santa Cruz
B-III-Tubulina	Ms	Nitrocelulosa	1/5000	Sigma
Actina	Ms	Nitrocelulosa	1/1000	Sigma
GFP	Ms	Nitrocelulosa	1/200	Clontech

Goat: cabra / Ms: ratón / Rat: rata / Rb: conejo / PVDF: Di-fluoruro de polivinilideno

## **10. BIOTINILACIÓN: MARCAJE DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CELULAR CON BIOTINA.**

El marcaje de superficie por biotilación es una herramienta muy útil para la detección selectiva de proteínas expresadas en la membrana plasmática. En esta técnica se usan reactivos derivados de la biotina, unidos a un éster N-hidroxisuccinimida (NHS), que forman enlaces tipo amida con grupos amino libres. Puesto que son reactivos impermeables reaccionan con los grupos amino de residuos de lisina expuestos al medio extracelular. La técnica se basa en la alta afinidad de la avidina por biotina, que permite separar las proteínas de membrana biotiladas de aquellas que residen en el citoplasma o en compartimentos

subcelulares, que no han sido marcadas. Los transportadores de neurotransmisores presentan bucles extracelulares que contienen múltiples residuos de lisina y son susceptibles de ser biotinilados.

Las neuronas se siembran en placas de 6 pocillos (*Nunc*) a una densidad de 400000 células por pocillo. A los 16 DIV las neuronas se lavan tres veces con PBS 1X completo a 37°C (PBSc: NaCl 137mM, KCl 3,5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,4mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,9mM, MgCl<sub>2</sub> 0,9mM). Se hace un último lavado con PBSc a 4°C y se dejan las células durante 40 minutos en hielo para bloquear la internalización. Cada pocillo se incuba con Sulfo-NHS-SS-Biotina 1mg/ml (*Thermo scientific*) durante 30 minutos a 4°C. Tras la incubación, las células se lavan con L-lisina 100mM en PBSc glucosa 0,18% + BSA 0,2% durante 45 minutos a 4°C para bloquear la biotina que no haya reaccionado. A continuación se realiza un lavado rápido con PBSc y después se levantan las células con una solución de NaCl 150mM y Tris-HCl 50mM pH 7,4 que contiene inhibidores de proteasas (PMSF 0,4mM y pepstatina 4mM). Las células se lisan con un tampón de lisis (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM pH 7,4, EDTA 5mM, Tritón-X al 1%, SDS al 0,1%, deoxicolato sódico 0,25%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,4mM y pepstatina 4mM) durante 30 minutos a 4°C. Parte del lisado se reserva para su análisis mediante electroforesis e inmunodetección (fracción correspondiente a la proteína total: T) y el resto se incuba con estreptavidina-agarosa durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación rotatoria. Las partículas de agarosa se sedimentan por centrifugación y se lavan tres veces con el tampón de lisis. Finalmente, las proteínas unidas a la estreptavidina-agarosa se eluyen con tampón de carga Laemmli (Tris 65mM, glicerol 10%, SDS 2,3%, DTT 100mM, azul de bromofenol 0,01%) durante 10 minutos a 75°C.

Estas muestras se analizan mediante SDS-PAGE e inmunodetección (*Western Blot*) y análisis densitométrico. En las condiciones descritas la detección corresponde a la proteína presente en la superficie celular (proteína biotinilada: B).

## **11. INMUNOPRECIPITACIÓN EN CLUTIVOS CELULARES Y DETECCIÓN DE PROTEÍNA UBIQUITINADA.**

Las neuronas se siembran en placas de 6 pocillos (*Nunc*) a una densidad de 400000 células por pocillo. A los 16 DIV las neuronas se lavan con PBSc a 37°C y se levantan con una solución de NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM + N-etilmaleimida (NEM) 50mM. Tras lisis mecánica se cuantifica la cantidad de proteína de cada pocillo, se aparta de cada muestra la misma cantidad de proteína y se igualan los volúmenes de cada una de ellas si es necesario.

Añadimos a cada muestra SDS 10% y las hervimos (10 min) para eliminar cualquier interacción. A continuación, añadimos tanta cantidad de tampón de lisis como sea necesario para diluir el SDS hasta una concentración final de 0,1% e incubamos a 4°C durante 30 minutos. Eliminamos los núcleos con una centrifugación de 15 min a 12000rpm y a 4°C. De este lisado, se separa una fracción de proteína total. En el resto de cada una de las muestras se añade el anticuerpo específico de GlyT2 (1µg anticuerpo/83µg de proteína) y se incuba a 4°C durante toda la noche. Una de las muestras no tendrá anticuerpo. Tras la incubación con anticuerpo, se añade a cada muestra proteína G agarosa (PGA) (1,3µL/µg de proteína) y se deja 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Después, se centrifuga 3 min a 6000rpm para precipitar la resina agarosa junto con el anticuerpo unido y la proteína específica que reconoce el anticuerpo. El sobrenadante se guarda como fracción de proteína no inmunoprecipitada (no IP). El precipitado se lava tres veces con tampón de lisis (RIPA 1X con Tritón 1X) y el último precipitado se resuspende en tampón de carga Laemmli 2X y se incuba 15 min a 75 grados.

Para detectar la ubiquitina de la proteína GlyT2 inmunoprecipitada, la muestra se carga en un gel de poliacrilamida al 6%. La proteína se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (no hacer tinción con rojo ponceau), esta membrana se trata con un tampón de desnaturalización para mejorar el acceso del anticuerpo a la proteína (Hipoclorito de guanidinio 6M, Tris 20mM pH 7,4, PMSF 1mM y β-mercaptoetanol 5mM). El resto del procedimiento de inmunodetección de proteínas en membrana se continúa tal y como se describe en el apartado 4.

## **12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS NITROSILADAS.**

Se extrae el tejido (médula espinal de rata) en el mismo día y se disgrega, en oscuridad, en tampón HEN (HEPES 50mM, EDTA 2mM, Neocuproina 1mM y NaCl 100mM - pH 7,8) utilizando un Potter Elvehjem (vidrio-vidrio). La suspensión se centrifuga 6 min a 3600g y a 4°C. El sobrenadante se recupera y el precipitado se vuelve a disgregar y centrifugar en las mismas condiciones. Se recolectan los sobrenadantes, se mide la concentración de proteína, y se divide en tantos tubos como tratamientos se vayan a realizar (máximo 300µg de proteína para GlyT2 en médula espinal de rata). Se añade el tratamiento en cada muestra durante 15 minutos en agitación a 37°C en oscuridad. A continuación se añade 1/3 del volumen de tampón HENS 3X de bloqueo (los componentes deben quedar una concentración final de: NaCl 100mM, HEPES 50mM, EDTA 2mM, Neocuproina 1mM, SDS 1% y Tritón X-100 0,5%, añadiendo además NEM 50mM que se unirá a los grupos SH libres) y se deja actuar durante 45 min en oscuridad a 37°C y en agitación. Una vez bloqueada la muestra se añade

lisina 10mM (que se unirá al exceso de NEM) durante 20 min. Después se toma una muestra de proteína total. El resto se divide en dos partes: una de las alícuotas de cada tratamiento se trata con ascorbato de sodio 10mM (15 min) a temperatura ambiente y en oscuridad para reducir aquellas cisteínas nitrosiladas y que queden disponibles para interactuar con biotina; la otra alícuota de la muestra se añade lisina 10mM en las mismas condiciones y será el blanco, ya que todas las cisteínas de esta alícuota estarán bloqueadas y la biotina no interactuará con ellas. La lisina y el ascorbato se preparan en HES (HEPES 50Mm, EDTA 2Mm, SDS 1% y NaCl 100mM). Cada muestra (máximo 100µg de proteína) se incuba con BMCC-biotina 8µM (*Thermo scientific*) durante toda la noche a 4°C en movimiento suave. Al día siguiente se añade anticuerpo anti-GlyT2 para inmunoprecipitar el transportador. Se realizan dos controles sin anticuerpo, uno con fracción de proteína total y otro con fracción de proteína biotinilada. Se deja la inmunoprecipitación durante toda la noche a 4°C en oscuridad en agitación suave. Al día siguiente se añade a todas las muestras PGA pre-hidratada en HES (40µL / 100µg de proteína) y se incuba durante 1 hora a 4°C en agitación suave. Después se centrifuga a 8000 rpm 6 min, se toma una alícuota del sobrenadante como fracción “noIP” y se hacen tres lavados (7 min) del precipitado centrifugando en cada lavado (6 min; 8000 rpm). Finalmente se añade Laemmli 2X sin agente reductor para no eliminar la interacción de la biotina, calentamos a 75°C durante 15 minutos en agitación y dejamos las muestras durante una noche a temperatura ambiente. Se agita cada muestra antes de aplicarla en cada carril del gel SDS-PAGE. Tras la transferencia, primero se revela con estreptavidina-HRP: no se debe ver señal en la fracción de PT (ya que no hay biotina), ni de blanco (ya que los grupos de unión a biotina están bloqueados con NEM), ni en los controles de IP (ya que no hay GlyT2). Después se revela con GlyT2 (Rata).

### **13. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE GLICINA.**

Los ensayos se realizan a 37°C y por triplicado para cada condición experimental. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

Entre 5 y 6 horas antes de realizar el experimento de transporte en neuronas, se reemplaza el medio de cultivo por HCSS, de esta manera se elimina el efecto de sensibilización que tiene el rojo fenol del medio de cultivo sobre los receptores purinérgicos. Pocos minutos antes de comenzar el ensayo, las células se lavan con PBSc + glucosa 0'18% (PBSc-glucosa) atemperado a 37°C. A continuación se realiza el experimento de transporte: en primer lugar se añade PBSc-glucosa (control), o el antagonista, o inhibidor correspondiente durante el tiempo necesario preparado en PBSc-glucosa (varias horas, o entre cinco y diez minutos según las

necesidades del reactivo). Sobre este medio se añade el agonista 10 veces concentrado o el vehículo según corresponda durante un tiempo de 5 minutos. Se retiran los tratamientos e inmediatamente y sin lavar, se añade el **medio radiactivo**: PBSc-glucosa + glicina 1μM + [<sup>3</sup>H]-glicina 0,04nM (*[2-3H]-glicina 1.6 TBq/mmol; PerkinElmer Life Sciences*) + ALX5407 10μM (*Axon Labs*) (NFPS: inhibidor de la actividad de GlyT1) durante 7 min. Finalmente se aspira el medio, se realiza un lavado con PBSc-glucosa y se deja secar los pocillos de la placa a temperatura ambiente.

Las células se lisan añadiendo a cada pocillo 200μl de NaOH 0,2N durante 2h a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Se utilizan 20μL de cada pocillo para la determinación de la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford (*BioRad*) y 100μL de la muestra mezclada con líquido de centelleo (*OptiFluor®-Perkin*) para la determinación de [<sup>3</sup>H]-glicina en contador de centelleo (1450 Microbeta).

Para calcular qué cantidad de glicina radiactiva se ha incorporado al cultivo por la actividad de GlyT2, se realiza en paralelo una réplica exacta del experimento añadiendo al medio radiactivo el inhibidor específico de GlyT2: ALX1393 0,4μM.

Los experimentos de determinación de parámetros cinéticos se realizan variando las concentraciones de glicina entre 1-1000μM (cinética para glicina).

La determinación de la actividad del transportador, expresada en nmol de glicina/ mg proteína, se calculó con la siguiente fórmula:

$$= \frac{[\text{glicina}] \cdot \text{CPM} \cdot \text{Volumen de proteína medida}}{\text{CPM estándar} \cdot \text{Volumen de contaje} \cdot \text{mg de proteína}}$$

CPM: cuentas por minuto de la muestra / CPM estándar: cuentas por minuto de 10μl de medio de transporte empleado en el ensayo / mg de proteína: miligramos de proteínas de la muestra determinados en el ensayo de Bradford.

#### **14. ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES.**

Los ensayos se realizan a 37°C y por triplicado para cada condición experimental. Cada experimento se repitió al menos, tres veces.

Cultivos primarios se siembran en placas multi-pocillo y se dejan crecer durante 16 días. Entre 5 y 6 horas antes de realizar el experimento, se reemplaza el medio de cultivo por HCSS. Antes de empezar se lavan las células con PBSc-glucosa, y se hace una precarga con [<sup>3</sup>H]-glicina o [<sup>3</sup>H]-glutamato (100nM) durante 30 minutos en agitación a 37°C. Tras la carga, los cultivos se lavan 2 veces durante 15 minutos en agitación con PBSc-glucosa. Con las células cargadas y lavadas, añadimos el agonista βγ-meATP o el vehículo (PBS) en medio

PBSc-glucosa durante 5 minutos (con NFPS 10µM en el caso de la liberación de glicina), este medio, se recuperó para medir la cantidad de tritio liberada durante estos cinco minutos (Medida 1, solo en el caso de la liberación de glicina). Sobre el cultivo, sin lavar, se añadió medio PBSc-glucosa (con NFPS 10µM en el caso de la liberación de glicina) durante otros 7 min. Este medio se recuperó para medir la radiactividad liberada durante este segundo periodo (Medida 2 de liberación de glicina). En el caso de la liberación de glutamato, se tomó una única medida después de la adición del agonista/vehículo que se corresponde a la suma del tiempo de actuación (fase I) 5 min + el tiempo de activación (fase II) 7 min posteriores. El mismo procedimiento se realizó en distintos medios para poder determinar la radiactividad liberada por difusión (PBSc 0,18% glucosa + TTX 0,25µM + EGTA 300µM + toxina botulínica 80nM + NFPS) de la liberada mediante fusión de vesículas sinápticas (PBSc 0,18% glucosa NFPS 10µM). Simultáneamente se realizó el mismo experimento con KCl 10mM para determinar la máxima liberación. En ningún caso, se llegó a alcanzar esta medida en los cultivos con medio PBSc-glucosa.

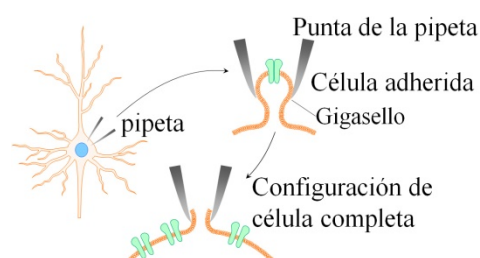
La cantidad de neurotransmisor liberado por vesículas sinápticas se calculó con la fórmula descrita, y restando el valor de radiactividad liberada por difusión en presencia de inhibidores de exocitosis de vesículas sinápticas.

$$= \frac{[100\text{nM}] \cdot \text{CPM} \cdot \text{Volumen de proteína medida}}{\text{CPM estándar} \cdot \text{Volumen de contaje} \cdot \text{mg de proteína}}$$

CPM: cuentas por minuto de la muestra / CPM estándar: cuentas por minuto de 10µl del medio de radiactivo empleado en el ensayo / mg de proteína: miligramos de proteínas de la muestra determinados en el ensayo de Bradford.

## **15. EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA.**

Para detectar cambios en la neurotransmisión glicinérgica tras la aplicación del agonista, se ha utilizado la técnica de *Patch-clamp* en la configuración de célula completa, para ello, se realiza un gigasello entre la pipeta de cristal y los lípidos de la membrana celular: configuración de célula adherida (*cell-attached*), entonces se realiza una succión que rompe la membrana que separa el citoplasma del interior de la pipeta: configuración de célula completa.



Los registros se realizaron en cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal de 16DIV. Las pipetas de registro se fabricaron utilizando capilares de borosilicato y un estirador de pipetas P-97 (*Sutter Instrument Co.*) para que la resistencia de la pipeta fuera de entre 4-8 MΩ.

Los registros se realizaron en el modo de “fijación de voltaje” (“*voltage-clamp*”), y el potencial de membrana se fijó en -60mV. La composición de las soluciones de la pipeta fue la siguiente: dentro de la pipeta (en mM): CsCl 140; CaCl<sub>2</sub> 1; EGTA 10; BAPTA 1; MgCl<sub>2</sub> 1; Mg-ATP 4; QX-314 Cl 5; HEPES 10 (pH 7,4 ajustado con CsOH). La solución externa (en mM): KCl 2,4; NaCl 140; CaCl<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1; glucosa 10; HEPES 10 (pH 7,4 ajustado con NaOH). Para el registro de corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) glicinérgicas, se bloqueó la neurotransmisión glutamatérgica (DNQX 10μM, AP5 10μM) y gabaérgica (bicuculina 3μM). Al finalizar el experimento se comprobó, mediante la perfusión de estricnina 1μM, que las corrientes que se estaban registrando eran, efectivamente, glicinérgicas.

Las corrientes de célula completa fueron registradas empleando un amplificador MultiClamp700B (*Molecular Devices*) y un convertidor analógico/digital Digidata 1440A (*Molecular Devices*) conectados a un PC, usando el software pCLAMP 10 (*Molecular Devices*) tanto para el registro como para el análisis. Los datos se obtuvieron a 20kHz y se filtraron a 4kHz. Todas aquellas células con una resistencia en serie > 20 MΩ o con cambios en la resistencia en serie de más del 20% a lo largo del experimento fueron descartadas para el análisis. La cámara de registro fue continuamente perfundida con solución externa aproximadamente a una velocidad de 5 ml/min, y los cambios en la perfusión fueron controlados mediante un sistema de 6 canales VC-6 (*Warner Instruments*). Todos los experimentos fueron realizados a 25°C; la temperatura fue controlada mediante un sistema automático de control TC-324B (*Warner Instruments*).

## 16. AGONISTAS DE P2: Farmacología de receptores purinérgicos

(Ver en [https://www.tocris.com/scientificReviews.php?ItemId=268401#.WMnl\\_fk1\\_IV](https://www.tocris.com/scientificReviews.php?ItemId=268401#.WMnl_fk1_IV))

Nombre de reactivo		
Actividad	Concentración de uso	Casa comercial
<b>A-317491 sal de amonio hidratada</b> : 5-[[[(3-Phenoxyphenyl)methyl][(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]amino]carbonyl]-1,2,4-benzenetricarboxylic acid sodium salt hydrate. C <sub>33</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>8</sub> ·xNa <sup>+</sup> ·yH <sub>2</sub> O		
Antagonista de P2X <sub>3</sub> y P2X <sub>2/3</sub> .	0,5 μM	Sigma
<b>A-438079</b> : 3-[[5-(2,3-Dichlorophenyl)-1H-tetrazol-1-yl]methyl]pyridine hydrochloride. C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> C <sub>12</sub> N <sub>5</sub> ·HCl		
Antagonista de P2X <sub>7</sub>	10μM	Sigma
<b>αβ-meATP</b> : α,β-Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>12</sub> P <sub>3</sub>		
Antagonista de P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>3</sub> y P2X <sub>2/3</sub> .	1-5μM (P2X <sub>1</sub> -P2X <sub>3</sub> ) 100μM (P2X <sub>7</sub> )	Sigma

**AF-353 hydrochloride:** 5-[5-iodo-4-methoxy-2-(1-methylethyl)phenoxy]-2,4-

pyrimidinediaminehydrochloride, Ro 4 hydrochloride.  $C_{14}H_{17}IN_4O_2 \cdot HCl$

Antagonista de P2X <sub>3</sub> y P2X <sub>2/3</sub> .	0,5μM	Sigma
--	-------	-------

**βγ-meATP:** βγ-Methylenneadenosine 5'-triphosphate disodium salt  $C_{11}H_{16}N_5Na_2O_{12}P_3$

Agonista de P2X1, P2X3 y P2X2/3.	1 - 50μM	Sigma
----------------------------------	----------	-------

**BBG:** Brilliant Blue G  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$

Antagonista de P2X4 y P2X7	5-10μM (P2X4-P2X7)	Sigma
----------------------------	--------------------	-------

**BzATP:** 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt

$C_{24}H_{24}N_5O_{15}P_3 \cdot xC_6H_{15}N \cdot yH_2O$

Agonista de P2X7	300μM	Sigma
------------------	-------	-------

**2-MeThio-ADP:** 2-(Methylthio)adenosine 5'-diphosphate trisodium salt hydrate

$C_{11}H_{14}N_5Na_3O_{10}P_2S \cdot xH_2O$

Agonista de receptores purinérgicos P2Y1	1 μM	Sigma
--	------	-------

**2-MeThio-ATP:** 2-Methylthioadenosine- 5' - triphosphate tetrasodium salt  $C_{11}H_{14}N_5Na_4O_{13}P_3S \cdot 6H_2O$

Agonista de receptores purinérgicos P2X2.	100μM	Tocris
---	-------	--------

**MRS2179 sal de amonio hidratada:** 2'-Deoxy-N6-methyl adenosine 3', 5'-diphosphate diamonium salt

$C_{11}H_{17}N_5O_9 \cdot xNH_3 \cdot H_2O$

Antagonista de P2Y1	10μM	Sigma
---------------------	------	-------

**PPADS:** Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate

$C_{14}H_{10}N_3Na_4O_{12}PS_2 \cdot xH_2O$

Antagonista de receptores purinérgicos P2X y P2Y	10μM (P2X2)	Sigma
--	-------------	-------

**Suramina sal sódica**  $C_{51}H_{34}N_6Na_6O_{23}S_6$

Antagonista de receptores P2X y P2Y.	100μM	Sigma
--------------------------------------	-------	-------

**TNP-ATP hydrate:** 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate monolithium trisodium salt.

$C_{16}H_{13}N_8O_{19}P_3LiNa_3 \cdot xH_2O$

Antagonista de receptores purinérgicos P2X.	1-5μM (P2X <sub>1</sub> -P2X <sub>3</sub> ) 100μM (P2X <sub>7</sub> )	Sigma
---	--	-------

## **17. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.**

El ajuste de los datos experimentales, los cálculos cinéticos y los análisis estadísticos se han llevado a cabo con el programa GraphPad. Los análisis estadísticos se realizan con los datos obtenidos de al menos tres experimentos, utilizando el análisis de varianza ANOVA de



un factor, test de Tukey o ANOVA de dos factores, test de Bonferroni para comparaciones múltiples y análisis *t*-Student para datos apareados con igualdad de varianzas o el test de Welch cuando no se asumía igualdad de varianzas. En las figuras las barras de error indican +/- error estándar de la media (SEM) de determinaciones por triplicado.

## **18. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.**

Elaboración de las secuencias de interferencia mediante los criterios “siRNA design software siDirect2.0” (<http://sidirect2.rnai.jp/>) (Naito and Ui-Tei 2012).

Para la predicción de residuos susceptibles de nitrosilación se utilizó el software GPS-SON.Prediction of S-nitrosylation (<http://sno.biocuckoo.org/>).



## **RESULTADOS**



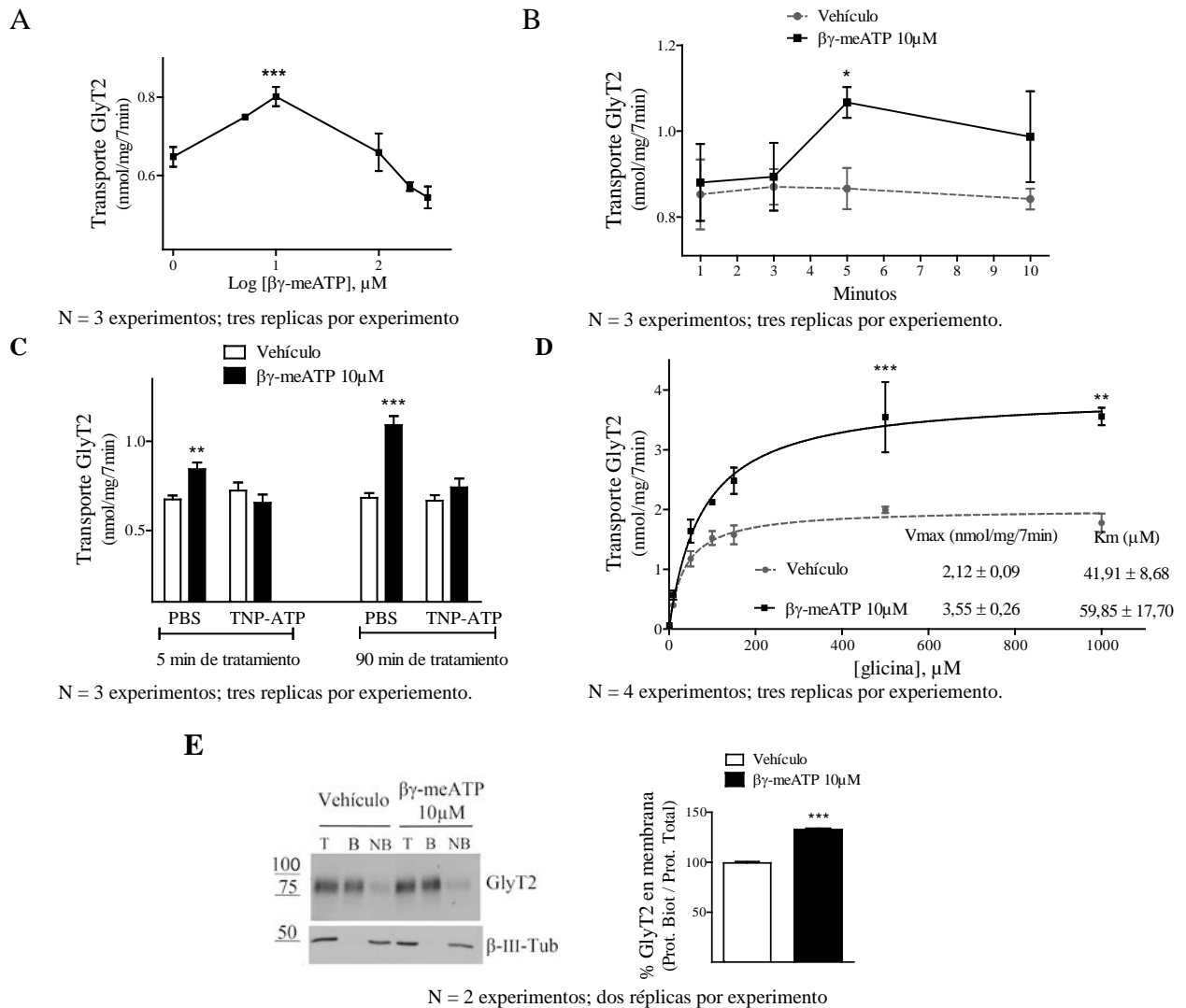
## **1. EFECTO DEL AGONISTA DE P2X3 – P2X2/3 ( $\beta\gamma$ -meATP) SOBRE EL TRANSPORTADOR NEURONAL DE GLICINA GlyT2.**

Para el estudio del papel que desempeña el transportador neuronal de glicina GlyT2 en vías nociceptivas, se utilizaron cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal de rata sobre los que se estimuló el receptor purinérgico P2X3 cuya implicación en la señalización del dolor está demostrada (Wirkner, Sperlagh et al. 2007, Burnstock 2013), y se evaluó la actividad de GlyT2.

La estimulación de P2X3 se llevó a cabo fundamentalmente con la sal disódica  $\beta,\gamma$ -metilen-adenosina 5'-trifosfato ( $\beta\gamma$ -meATP), un agonista específico este receptor (Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997). Se realizaron experimentos de medida de la actividad de transporte de GlyT2 a concentraciones crecientes de  $\beta\gamma$ -meATP para determinar la concentración de interés en el sistema complejo que constituye el cultivo primario de tallo cerebral y médula espinal donde la población de receptores purinérgicos es muy variada. De estos resultados (figura 1A) se concluyó que la concentración de  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M es la que más afecta a GlyT2 ya que aumenta la actividad del transportador un  $33,54 \pm 3,58\%$  con respecto a la situación control sin tratamiento.

Una vez determinada la concentración de agonista, se estableció el tiempo de tratamiento. Los cultivos se incubaron durante distintos tiempos con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M y se observó que era necesario un tratamiento de al menos cinco minutos para provocar un aumento del transporte de GlyT2 estadísticamente significativo:  $23,45 \pm 2,23\%$  (figura 1B). Con tratamientos de 90 minutos, la actividad del transportador incrementó hasta un  $59,63 \pm 7,31\%$ . Este efecto sobre GlyT2 no ocurre si se pone en el medio la sal tetrasódica 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato (TNP-ATP 1 $\mu$ M), un antagonista del receptor P2X3 (figura 1C) (Virginio, Robertson et al. 1998).

El aumento de la actividad del transportador puede deberse a una mayor eficiencia del transporte, a un mayor número de transportadores en membrana o a una mayor afinidad por el sustrato glicina. Estos aspectos pueden ser cuantificados por los parámetros cinéticos  $V_{max}$  (velocidad máxima del transporte) y  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) obtenidos mediante ensayos cinéticos variando la concentración extracelular de glicina entre 1 $\mu$ M y 1000 $\mu$ M. Se confirmó que en aquellos cultivos tratados con  $\beta\gamma$ -meATP, la  $V_{max}$  de GlyT2 aumentó un  $67,69 \pm 12,28\%$  (figura 1D). Finalmente, mediante biotilación de proteínas de superficie, confirmamos que la presencia de este agonista, provoca un aumento de hasta 33% de la cantidad de transportador en membrana (figura 1E).

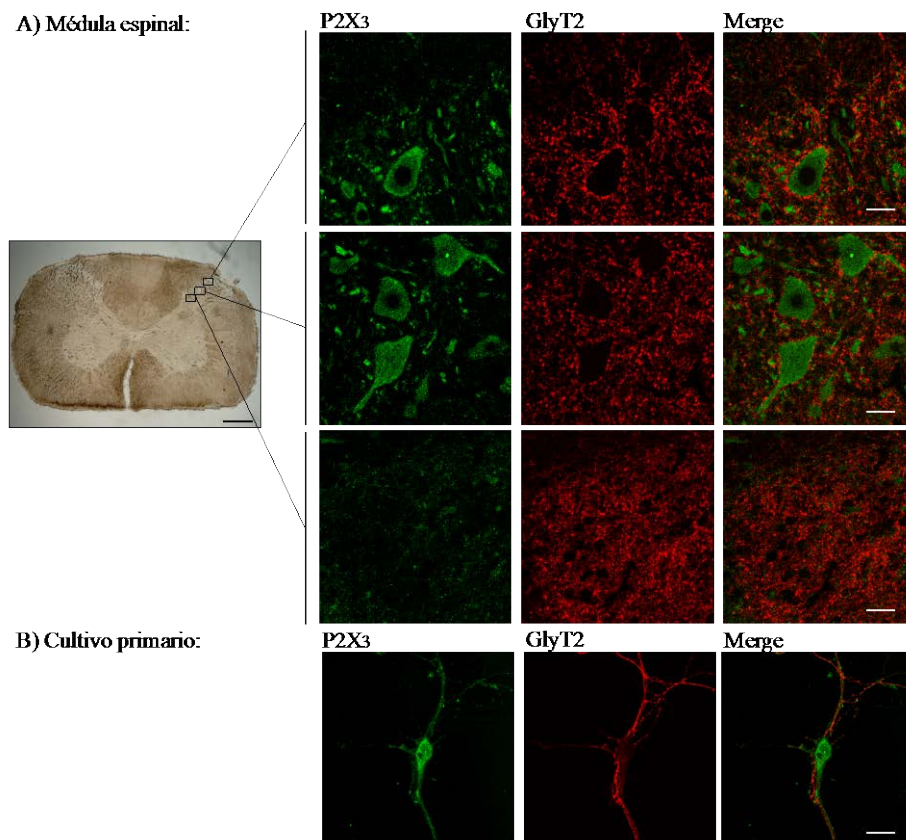


**Figura 1. Caracterización del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2 en cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal.** Se midió la actividad de transporte de GlyT2 durante 7 minutos después del tratamiento correspondiente en cada caso. **(A)** Se realizó un tratamiento previo de  $\beta\gamma$ -meATP durante 5 minutos a concentraciones de: 0, 5, 10, 100, 200, 300 $\mu\text{M}$ . \*\*\* Diferencia con respecto a la concentración cero,  $p < 0,001$ , mediante ANOVA de un factor, test de Tukey. **(B)** Los cultivos se incubaron con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu\text{M}$  durante 1, 3, 5, 10, min y **(C)** durante 90 min. **(C)** La presencia de TNP-ATP 1 $\mu\text{M}$  impide el aumento de actividad de GlyT2, tanto a 5 como a 90 min. **(D)** Cinéticas para glicina: la concentración extracelular de glicina ensayada fue de ( $\mu\text{M}$ ): 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{M}$ . **(B, C y D):** \*, \*\*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni. **(E)** Cuantificación del transportador presente en membrana mediante biotilación; tras el tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP o con vehículo se marcaron las proteínas de superficie con el reactivo sulfonhído-biotina, las proteínas marcadas se aislaron con estreptavidina inmovilizada y las muestras se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GlyT2. En el histograma se representa en porcentaje la media  $\pm$  SEM de la fracción de GlyT2 detectado como transportador biotilado (B) respecto

al transportador total (T) de al menos tres experimentos independientes. En la figura también se muestra la fracción no biotinilada (NB). Los datos se analizaron por densitometría mediante “Quantity One – 4.6.3 (Basic)”. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,0001$ , mediante prueba de *t*-Student.

## 2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE P2X3 Y GlyT2.

Está descrito que el receptor P2X3 se expresa en las astas dorsales de la médula espinal y en fibras sensoriales primarias de los DRG (Llewellyn-Smith and Burnstock 1998). Mediante inmunofluorescencia, confirmamos la presencia del receptor en el cultivo de tallo cerebral y médula espinal utilizado, y analizamos la distribución de éste con respecto a GlyT2 tanto en el cultivo como en las astas dorsales de la médula espinal de rata adulta (figura 2).



**Figura 2. Inmunofluorescencia de P2X3 y GlyT2 en médula espinal y en cultivo primario neuronal.**

(A) Inmunofluorescencia de secciones de 30 $\mu$ m de médula espinal de rata obtenidas como se indica en material y métodos, incubadas con anticuerpo anti-GlyT2 (rojo) y anti-P2X3 (verde). Se tomaron imágenes representativas de las astas dorsales en microscopio confocal Zeiss (objetivo 63X), la barra de escala blanca, corresponde a 20 $\mu$ m. La localización relativa de las imágenes de confocal, se indica en una imagen de corte transversal de médula espinal tratada con metanol al 10% para su contraste y tomada en microscopio de fluorescencia Leika en campo claro (objetivo 5X), la barra de escala negra, corresponde a 500 $\mu$ m. (B) Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron sembrados en cubres y

crecidos durante 16 días, se fijaron con metanol y se realizó una doble-inmunofluorescencia con anti-GlyT2 (rojo) y anti-P2X3 (verde), se tomaron imágenes representativas en microscopio confocal Zeiss (objetivo 63X), la escala corresponde a 20µm.

Coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, encontramos que P2X3 es especialmente abundante en las astas dorsales de la médula espinal (Llewellyn-Smith and Burnstock 1998). La inmunodetección de GlyT2 se observa en toda la médula, con un gran plexo de axones positivos en la región dorsal. Es de destacar que el receptor P2X3 no se localiza en las mismas neuronas que GlyT2, lo que implica que este receptor ejerce una regulación paracrina sobre el transportador.

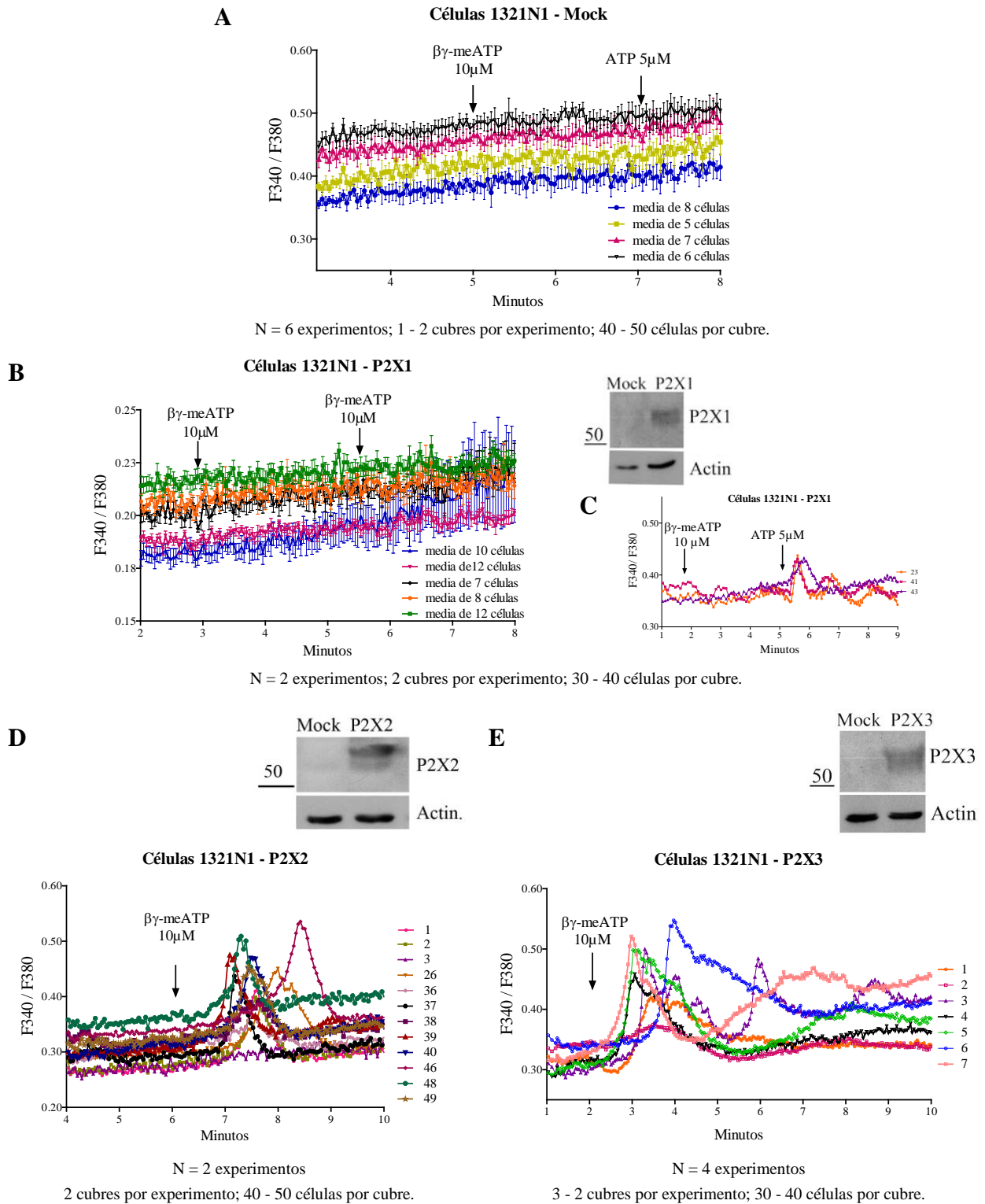
### **3. FARMACOLOGÍA:**

#### **3.1.- ESPECIFICIDAD DE $\beta\gamma$ -meATP EN CÉLULAS 1321N1 TRANSFECTADAS CON RECEPTORES PURINÉRGICOS.**

Una de las principales características de los receptores purinérgicos (P2) es que su activación viene acompañada de movilización de calcio citosólico (Centemeri, Bolego et al. 1997, De Roo, Rodeau et al. 2003). Esta característica, permite estudiar su activación en respuesta a agonistas mediante medidas de microfluorimetría de calcio. En el estudio de la farmacología de receptores purinérgicos, se utiliza habitualmente la línea celular 1321N1, un astrocitoma humano que no expresa receptores purinérgicos endógenos, lo que permite expresar un subtipo concreto de receptor y estudiarlo de manera individual. Para confirmar la especificidad del agonista  $\beta\gamma$ -meATP 10µM, se realizaron medidas de microfluorimetría en células 1321N1 transfectadas con receptores P2X1, P2X2 y P2X3 (figura 3).

En la figura 3A se confirmó que las células no transfectadas no responden a la aplicación de agonistas purinérgicos, ni tampoco lo hacen a la administración de ATP como ya han descrito anteriormente otros grupos (Parr, Sullivan et al. 1994, Lynch, Touma et al. 1999). Un 5% de las células registradas, presentaron variaciones de la razón de fluorescencia (ratio) espontáneas. Las células transfectadas con P2X1 tampoco respondieron al agonista  $\beta\gamma$ -meATP 10µM (figura 3B), y solo un 7,6% de las células registradas respondieron a ATP (figura 3C). Sin embargo, el 27% de las células transfectadas con P2X2 y el 22% de las transfectadas con P2X3, sí registraron un aumento del ratio en respuesta al agonista  $\beta\gamma$ -meATP 10µM (figura 3D y 3E).



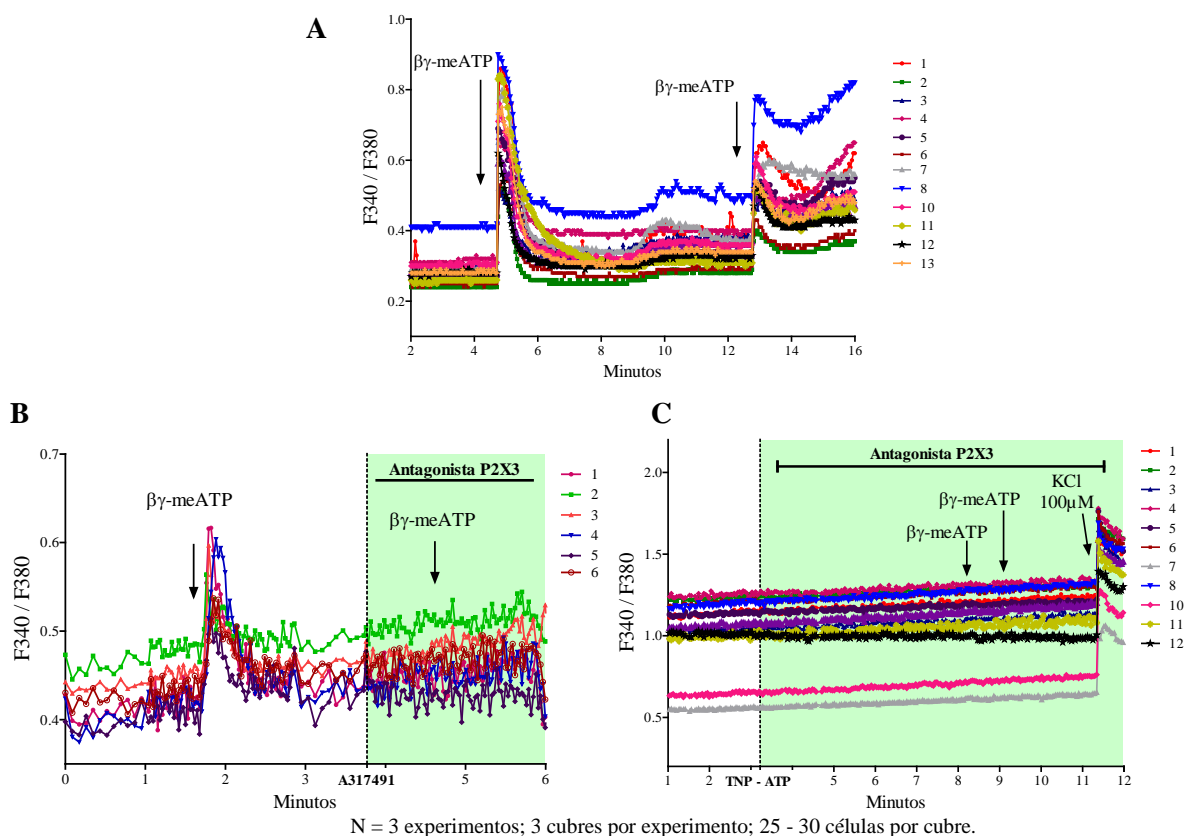


**Figura 3. Microfluorimetría de calcio en células 1321N1.** Las células sembradas en cubres se cargaron con la sonda fluorescente Fura 2-AM. En la gráfica, el aumento de la razón de fluorescencia ( $F_{340}/F_{380}$ ) o ratio, corresponde a un aumento de la concentración de calcio citosólico. Se representa el ratio en células 1321N1 control (A) y células 1321N1 transfectadas con el receptor P2X1 (B y C) P2X2 (D) y con P2X3 (E) en respuesta a  $\beta\gamma\text{-meATP } 10\mu\text{M}$  o ATP según se indica en cada gráfica. En cada caso, se midió al menos la actividad de 100 células. En A y B cada trazo corresponde a la media de 5-12 células;

en C, D y E cada trazo corresponde al ratio de una única célula. Se confirmó la expresión de los receptores transfectados mediante inmunodetección con anticuerpos anti-P2X1, anti-P2X2 y anti-P2X3.

### 3.2.- ESPECIFICIDAD DE $\beta\gamma$ -meATP EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES.

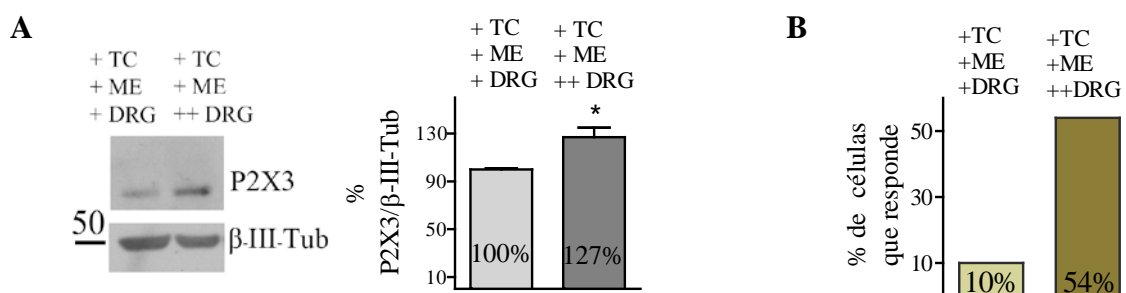
En la bibliografía, el  $\beta\gamma$ -meATP está descrito como un agonista específico de los receptores P2X3 (Garcia-Guzman, Stuhmer et al. 1997), pero en el laboratorio hemos demostrado que en células 1321N1 transfectadas, este reactivo es capaz de activar también a P2X2; ambas subunidades se expresan endógenamente en neuronas sensoriales (Cheung and Burnstock 2002). Para demostrar la funcionalidad de estos receptores en nuestro cultivo, recurrimos a las técnicas de microfluorimetría de calcio, y se analizó la respuesta de las neuronas a la aplicación del agonista. Como vemos en la figura 4A, la administración de  $\beta\gamma$ -meATP provoca un aumento del ratio en un 10% de las células registradas, esto no ocurría cuando el agonista se aplicaba en presencia de A317491 0,5 $\mu$ M o TNP-ATP 1 $\mu$ M (figura 4 B y C), dos antagonistas del receptor P2X3 (Virginio, Robertson et al. 1998, Jarvis, Burgard et al. 2002).



**Figura 4. Microfluorimetría de calcio en cultivos primarios neuronales.** Las neuronas se sembraron sobre cubres con PDL; a los 16 DIV, se incubaron con la sonda fluorescente Fura 2-AM y se registró la variación de la razón de fluorescencia ( $F_{340}/F_{380}$ ). Se muestran el ratio de neuronas en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M en situación control (A) y en presencia de antagonistas de P2X3 (B y C) según se indica

en cada gráfica. Cada trazo corresponde al registro de una única célula.

El receptor P2X3 y P2X2/3 es especialmente abundante en los DRGs (Serrano, Mo et al. 2012), por lo que decidimos comparar dos tipos de cultivos neuronales, uno el habitualmente utilizado: “cultivo de tallo cerebral y médula espinal” y otro cultivo similar pero que había sido cuidadosamente enriquecido en DRGs. Comparando ambos cultivos (figura 5) en experimentos de microfluorimetría de calcio se observó que el porcentaje de células que responden llega hasta un 54%, frente al 10% de células que responden en los cultivos habituales (figura 5B). Mediante inmunodetección se confirmó que en estos cultivos enriquecidos en DRG la proteína P2X3 era más abundante (figura 5A).

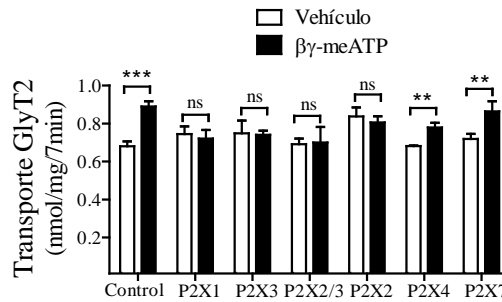


N = 2 experimentos; 3 cubres por experimento; 25 - 30 células por cubre.

**Figura 5. Comparación de cultivos primarios neuronales y cultivos neuronales enriquecidos en DRGs.** (A) expresión de P2X3 por inmunodetección con anticuerpo anti-P2X3 normalizado con  $\beta$ -III-tubulina en los dos tipos de cultivos primarios. (B) Resultados en porcentaje de microfluorimetría de células que responden con aumento de ratio en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP en los dos tipos de cultivos primarios. TC: tallo cerebral; ME: médula espinal; DRG: ganglios de las raíces dorsales. \* Diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,05$  mediante prueba de *t*-Student.

#### **4. RECEPTORES PURINÉRGICOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GlyT2.**

Mediante los experimentos de microfluorimetría se ha confirmado que el agonista  $\beta\gamma$ -meATP produce la activación de receptores P2X2 y P2X3 en los cultivos utilizados. Además en los experimentos de transporte se demostró que la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M durante al menos 5 minutos conlleva un aumento de la actividad del transportador neuronal de glicina GlyT2 de  $27,92 \pm 7,15\%$  (figura 1C). Sin embargo, las interacciones entre los distintos receptores P2 son frecuentes (Seo, Kim et al. 2008), por ello, se llevaron a cabo experimentos de transporte utilizando antagonistas para las distintas subunidades de los receptores P2X (figura 6) con el fin de saber si el efecto que observamos en el transportador GlyT2, se debe a la acción directa de P2X2, de P2X3 o de otros receptores activados de manera secundaria.



N = 3 – 5 experimentos (según el antagonista), 3 réplicas por experimento.

<http://www.sigmaldrich.com/>

[technical-documents/articles/biology/rbi-handbook/non-peptide-receptors-synthesis-and-metabolism/p2-receptors-p2x-ion-channel-family.html](http://technical-documents/articles/biology/rbi-handbook/non-peptide-receptors-synthesis-and-metabolism/p2-receptors-p2x-ion-channel-family.html).

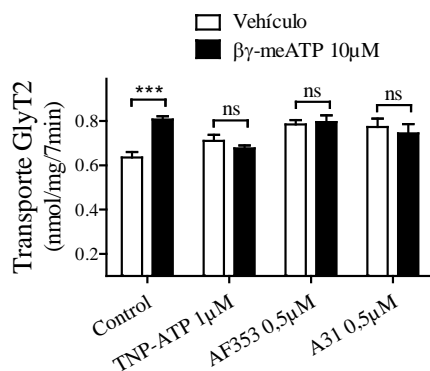
**Figura 6. Efecto de βγ-meATP sobre la actividad del transportador GlyT2 en ausencia o presencia de antagonistas de diferentes receptores purinérgicos ionotrópicos.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 5 min a 37°C con vehículo (PBS) o con βγ-meATP 10μM en ausencia (control) o presencia de distintos antagonistas de receptores purinérgicos añadidos 5 min antes del agonista; para inhibir P2X1, 3 y 2/3 se ha utilizado TNP-ATP a 0,05μM, 1μM, y 5μM respectivamente, para inhibir al receptor P2X2 se utilizó PPADS 10μM, P2X4 se inhibió con BBG 5μM y P2X7 con el antagonista A-438079 10μM. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo, p<0,05 p<0,0001, mediante prueba de *t*-Student.

De esta manera comprobamos que la inhibición de las subunidades 4 y 7, no impedía el efecto de βγ-meATP, que pasa de activar al transportador un 30,91 ± 2,68% en situación control sin antagonistas a activarlo un 15,27 ± 1,32% y 20,61 ± 4,87% en presencia de antagonistas de P2X4 y P2X7, respectivamente. La inhibición de las subunidades 1, 2, y 3 revertía el efecto de βγ-meATP sobre el transportador. La farmacología de estas tres subunidades se solapa (Thomas, Virginio et al. 1998) y a menudo los antagonistas no proporcionan una idea definitiva de los receptores que estamos afectando. Puesto que no hay una estricta especificidad farmacológica para estas tres subunidades y teniendo en cuenta los distintos abordajes experimentales en los que hemos comprobado que P2X1 no se activa por βγ-meATP (figura 3B), solo se analizaron los efectos de las P2X2 y P2X3 sobre el transportador GlyT2. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de transporte utilizando diversidad de herramientas farmacológicas y de RNA de interferencia.

#### 4.1.- P2X2/3 Y P2X2: βγ-meATP Y 2MeS-ATP.

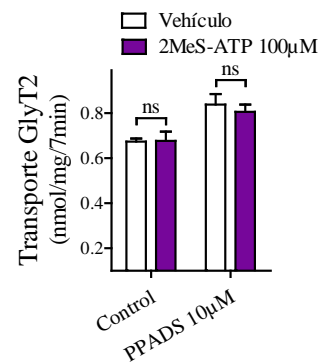
En primer lugar se utilizaron tres antagonistas diferentes del receptor P2X3 – P2X2/3: TNP-ATP 1μM (Virginio, Robertson et al. 1998); A317491 0,5μM (A31) (Jarvis, Burgard et al. 2002) y AF353 0,5μM (Gever, Soto et al. 2010) (figura 7), y a continuación se realizaron experimentos de transporte activando específicamente el receptor P2X2 con la sal tetrasódica 2-

(metil-tio) adenosina 5'-trifosfato hidratado (2MeS-ATP) 100 $\mu$ M (King, Wildman et al. 1997, Jacobson, Costanzi et al. 2006, Burnstock 2007, Morton-Jones, Vljakovic et al. 2015, Pollatzek, Hitzel et al. 2016). Como se muestra en la figura 7, todos los antagonistas revierten la activación del 26,98  $\pm$  2,20% de GlyT2 por tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP. Sin embargo, aunque que la inhibición de P2X2 con un tratamiento previo de PPADS 10 $\mu$ M impide el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2 (figura7), comprobamos que activando únicamente P2X2 no se modifica la actividad del transportador (figura 8).



N = 5 experimentos; 3 réplicas por experimento.

**Figura 7. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre la actividad del transportador GlyT2 en ausencia o presencia de antagonistas de P2X3 y P2X2/3.**



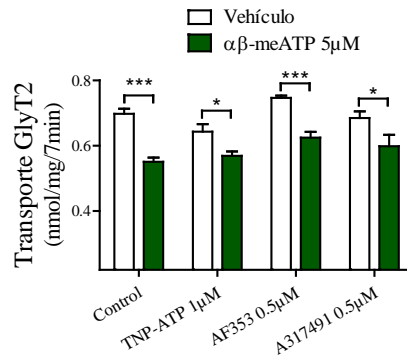
N = 3 experimentos; 3 réplicas por experimento.

**Figura 8. Efecto de 2MeS-ATP sobre la actividad del transportador GlyT2 en ausencia o presencia de antagonistas de P2X2.**

Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 5 min a 37°C con vehículo (PBS), o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M, o con 2MeS-ATP 100 $\mu$ M en ausencia (control) o presencia de distintos antagonistas de receptores purinérgicos añadidos 5 min antes del agonista. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,0001$  mediante prueba de *t*-Student.

#### 4.2.- P2X2/3 Y P2Y1: $\alpha\beta$ -MEATP Y 2MEs-ADP.

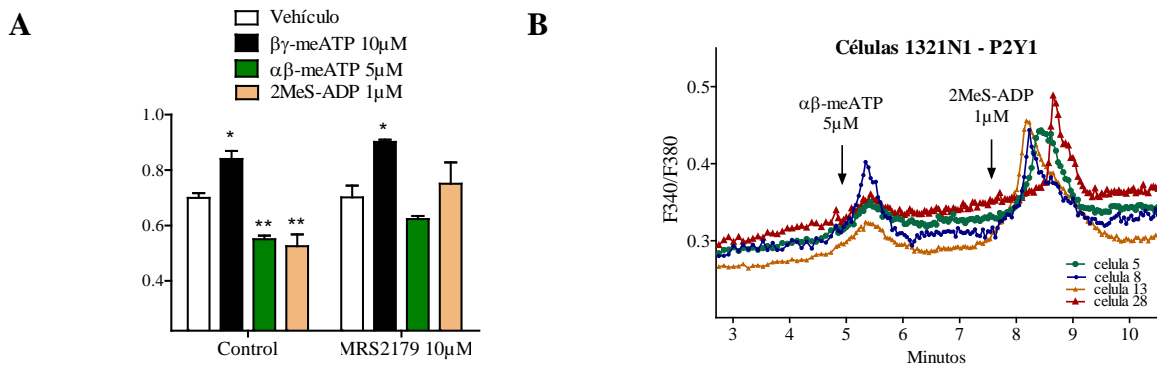
Los datos anteriores demuestran que la estimulación de P2X3 aumenta la actividad de GlyT2, y quisimos analizar el efecto de otro agonista de P2X3 y P2X2/3: el  $\alpha\beta$ -meATP 5 $\mu$ M (Helms, Kowalski et al. 2013). Sin embargo, este agonista tiene una química menos estable y desencadena el efecto opuesto a  $\beta\gamma$ -meATP. Al tratar cultivos primarios con  $\alpha\beta$ -meATP la actividad de GlyT2 disminuyó un 15,05  $\pm$  2,97%. Con la aplicación previa de distintos antagonistas confirmamos que el efecto inhibitorio sobre el transportador no estaba mediado por P2X3 ni por P2X2/3 (figura 9), ya que en presencia de TNP-ATP 1 $\mu$ M, AF353 0,5 $\mu$ M y A317491 0,5 $\mu$ M el agonista  $\alpha\beta$ -meATP también disminuía significativamente la actividad de GlyT2 un 11,43  $\pm$  4,36%, 16,28  $\pm$  2,09%, 12,56  $\pm$  5,49% respectivamente.



N= 8 experimentos; 3 réplicas por experimento.

**Figura 9. Efecto de antagonistas de P2X3 y P2X2/3 sobre la actividad del transportador GlyT2 en ausencia o presencia de αβ-meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 5 min a 37°C con vehículo (PBS), o con αβ-meATP 5µM en ausencia (control) o presencia de distintos antagonistas de receptores purinérgicos añadidos cinco minutos antes del agonista. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$  mediante prueba de *t*-Student.

La inestabilidad de estos agonistas está documentada (Joseph, Pifer et al. 2004), por lo que nos planteamos la posibilidad de que el αβ-meATP estuviera siendo rápidamente degradado por ectonucleotidasas presentes en el cultivo celular generando así productos que actuarían sobre otras dianas como los receptores de adenosina (P1), o incluso sobre otros receptores purinérgicos (P2XR, P2YR).



N= 3 experimentos; 3 réplicas por experimento.

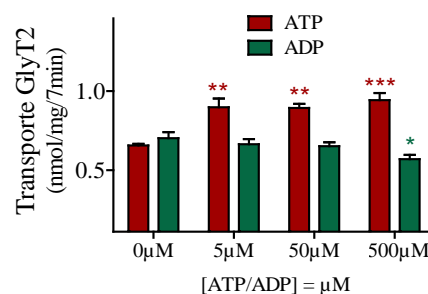
**Figura 10. Efecto de agonistas de P2X3 y P2X2/3 sobre la actividad del transportador GlyT2 en presencia de antagonistas de P2Y1 en cultivos primarios neuronales y efecto de αβ-meATP sobre P2Y1 transfectado en células 1321N1.** (A) Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 5 min a 37°C con vehículo (PBS), βγ-meATP 10µM, αβ-meATP 5µM o 2MeS-ADP (agonista de P2Y1) en ausencia (control) o presencia del inhibidor de P2Y1 el MRS2179 añadido 5 min antes del agonista. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni. (B) Las células sembradas en cubres se cargaron con la sonda fluorescente Fura 2-AM. En la

gráfica, el aumento del ratio (F340/F380) corresponde a un aumento de la concentración de calcio citosólico. Se muestran las variaciones ratio en células 1321N1 transfectadas con el receptor P2Y1. Cada trazo corresponde a una única célula.

Mediante experimentos de transporte se comprobó que  $\alpha\beta$ -meATP y 2MeS-ADP, inhibían al transportador, y en células 1321N1 transfectadas con P2Y1, ambos agonistas activaban este receptor. Además, esta inhibición del GlyT2 por  $\alpha\beta$ -meATP y 2MeS-ADP, se revertía por la presencia del antagonista de P2Y1 MRS2179 (10 $\mu$ M) (figura 10). En nuestro laboratorio, un trabajo anterior había demostrado que la estimulación de P2Y1 inhibe a GlyT2 (Jimenez, Zafra et al. 2011).

#### 4.3.- RECEPTORES P2 IONOTRÓPICOS Y METABOTRÓPICOS: ATP Y ADP.

Algunos grupos han atribuido a los receptores purinérgicos P2 la función de promover o inhibir la liberación de neurotransmisores como GABA, glicina y glutamato (Mori, Heuss et al. 2001, Papp, Vizi et al. 2004, Xiao, Zhou et al. 2008). Además, los resultados aquí presentados junto con los descritos anteriormente en el laboratorio, parecen atribuir a los P2 la función de controlar la cantidad de NT glicina disponible en el entorno extracelular mediante su capacidad para regular a los GlyTs. En particular, se ha descrito que P2Y1 y P2X2/3 regulan de forma opuesta la liberación de glutamato, donde P2Y1 inhibe y P2X2/3 aumenta la liberación de este NT (Gerevich, Muller et al. 2005, Rodrigues, Almeida et al. 2005, Gerevich, Zadori et al. 2007). Los receptores purinérgicos, se activan por ADP y ATP, siendo los P2YR más susceptibles de activarse por la presencia de ADP (*ADP-preferring*), mientras que los P2XR ionotrópicos lo hacen preferentemente como respuesta a ATP (*ATP-preferring*). Se realizaron experimentos de transporte a dosis crecientes de ADP y ATP (figura 11) con el fin de apreciar si existía este efecto opuesto de inhibición y activación sobre el transportador GlyT2.



N= 2 experimentos; tres réplicas por experimento.

**Figura 11. Actividad del transportador GlyT2 en respuesta a dosis crecientes de ATP y ADP.**

Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 5 min a 37°C con distintas concentraciones de ATP o de ADP. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*, \*\*\* Diferencia respecto a 0 $\mu$ M, p< 0,05, p<0,005, p<0,0005

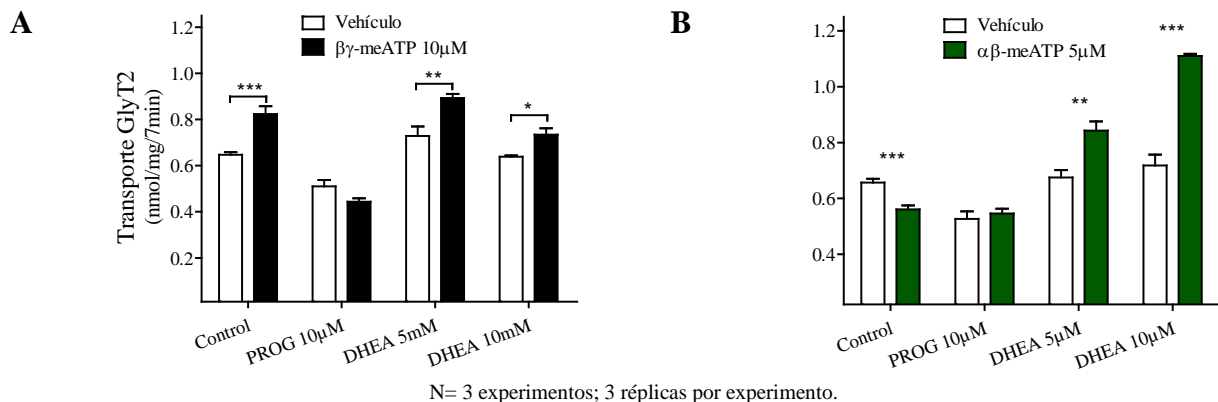


mediante ANOVA de un factor, test de Tukey.

Los resultados confirmaron efectos contrarios para cada uno de los tratamientos sobre la actividad de GlyT2, donde el ATP a las concentraciones de 5, 50 y 500 $\mu$ M activó el transporte un  $33,03 \pm 8,13\%$ ,  $32,22 \pm 3,79\%$ ,  $39,63 \pm 6,78\%$  respectivamente, y el ADP lo inhibió de forma significativa un  $16,58 \pm 4,06\%$  a la concentración de 500 $\mu$ M.

#### 4.4.- NEUROESTEROIDES: dehidroepiandrosterona (DHEA) y progesterona (PRO).

Existen herramientas farmacológicas que pueden proporcionar información para entender los diferentes efectos observados entre los agonistas de P2X3 utilizados. Es el caso de los neuroesteroides dehidroepiandrosterona (DHEA) y progesterona (PRO). Se ha demostrado que estas hormonas potencian las corrientes de calcio generadas por la activación de los receptores homoméricos P2X2 o heteroméricos P2X2/3; o bien las inhiben. Concretamente, se ha descrito que la DHEA reduce las corrientes de P2X3 de forma dosis dependiente (Liu, Hsieh et al. 2001), y que entre las concentraciones de 10 $\mu$ M y 20 $\mu$ M, potencia las corrientes de receptores heteroméricos que contienen P2X2 (De Roo, Rodeau et al. 2003). Sin embargo, la progesterona potencia exclusivamente aquellas corrientes de calcio originadas por la activación del homómero P2X2 (De Roo, Boue-Grabot et al. 2010). Así, los cultivos fueron pretratados con estos esteroides con el fin de potenciar el efecto de uno u otro agonista utilizado y confirmar nuestra hipótesis del blanco de  $\alpha\beta$ -meATP y  $\beta\gamma$ -meATP.



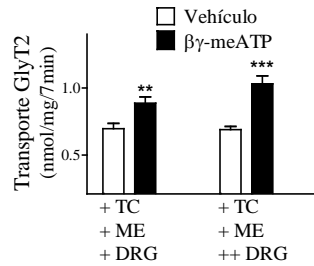
**Figura 12. Efecto de agonistas P2X sobre GlyT2 en presencia de esteroides.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 60 min con esteroides neuromoduladores: PROG 10 $\mu$ M (progesterona) y DHEA (dehidroepiandrosterona) a 5 y 10 $\mu$ M. A continuación se trataron durante 5 min y a 37°C con vehículo (PBS) o distintos agonistas: (A)  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M y (B)  $\alpha\beta$ -meATP 5 $\mu$ M. En la situación control se representa el efecto de los agonistas en ausencia de esteroides. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*, \*\*\* Diferencia respecto al vehículo con el pretratamiento correspondiente en cada caso,  $p < 0,02$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0005$  mediante prueba de *t*-Student.



Se observó que en los cultivos previamente tratados con DHEA disminuía la magnitud del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP de forma dosis dependiente (figura 12A). Así tenemos, que en la situación control sin tratamiento,  $\beta\gamma$ -meATP provocó un aumento de la actividad de GlyT2 del  $24,67 \pm 7,90\%$ , que en presencia de DHEA fue de  $22,58 \pm 7,47\%$  y  $15,24 \pm 4,24\%$  a  $5\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$  respectivamente; lo que demuestra que  $\beta\gamma$ -meATP estimula la actividad de P2X3. Además, comprobamos que tras el tratamiento con DHEA, desaparecía el efecto inhibitor de  $\alpha\beta$ -meATP ( $-14,57 \pm 3,29\%$ ) y se producía un aumento de la actividad de GlyT2 de  $24,80 \pm 6,82\%$  con DHEA  $5\mu\text{M}$ , y un aumento mayor de  $65,68 \pm 1,36\%$  a la concentración de  $10\mu\text{M}$  (figura 12B). Estos resultados sugieren que en presencia de DHEA, un potenciador de la activación del heterómero P2X2/3, el  $\alpha\beta$ -meATP es capaz de revertir la inhibición mediada por P2YRs y activar al transportador (figura 10). Con el uso de PROG (potenciador P2X2) no se producía el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP ni de  $\alpha\beta$ -meATP sobre GlyT2, lo que indica que la sola activación del homómero P2X2 no tiene efecto alguno sobre el transportador y que la estimulación de GlyT2 esta mediada por la activación de P2X3 (figura 12A y B).

#### **4.5.- CONSECUENCIAS DE LAS VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X3: cultivos enriquecidos en DRGs o shRNA interferencia.**

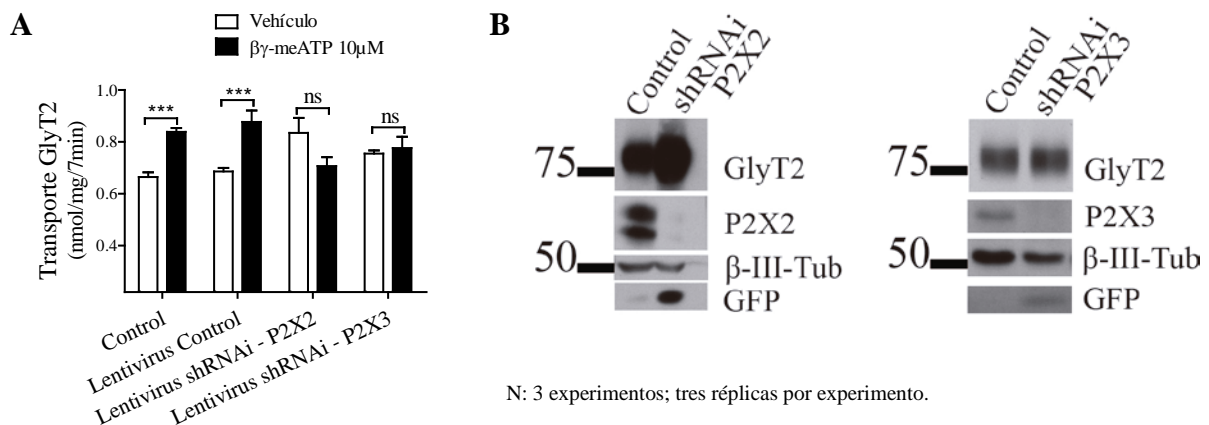
Como se ha descrito en la figura 5, uno de los abordajes experimentales para corroborar qué receptores median la señalización purinérgica que regula a GlyT2, fue la preparación de cultivos primarios cuidadosamente enriquecidos en DRGs, lo que llevó a un aumento del 27% de la detección de receptor P2X3 en el cultivo mediante inmunodetección, y a un 44% más de respuestas de calcio con la adición del agonista  $\beta\gamma$ -meATP. Adicionalmente, se realizaron experimentos de transporte comparando estos dos cultivos (figura 13) y el resultado fue un aumento de la magnitud del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre la actividad del transportador que iba de un  $27,28 \pm 8,78\%$  a un  $48 \pm 8,29\%$ .



N: 3 experimentos; tres réplicas por experimento.

**Figura 13. Comparación la actividad de GlyT2 de cultivos primarios neuronales y cultivos neuronales enriquecidos en DRGs en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios se trataron 5 min a 37°C con vehículo (PBS) o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*\*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0005$  mediante prueba de *t*-Student. TC: tallo cerebral; ME: médula espinal; DRG: ganglios de las raíces dorsales.

Por último, se diseñaron secuencias de RNAi de interferencia para las subunidades P2X2 y P2X3 con las que se infectaron cultivos neuronales de tallo cerebral y médula espinal, estos cultivos se utilizaron para medir la actividad del transportador GlyT2 y compararlos en paralelo con cultivos sin infectar, y cultivos infectados con un virus control (figura 14), de esta manera se confirmó mediante técnicas no farmacológicas, que tanto la ausencia de receptores P2X3 como la de P2X2 impedía que el  $\beta\gamma$ -meATP estimulara la actividad del transportador GlyT2. La variación de la actividad de GlyT2 en el cultivo sin infectar y el cultivo infectado con el virus control al estimularlos con  $\beta\gamma$ -meATP fue similar:  $26,29 \pm 3,65\%$  y  $27,86 \pm 6,82\%$  respectivamente.



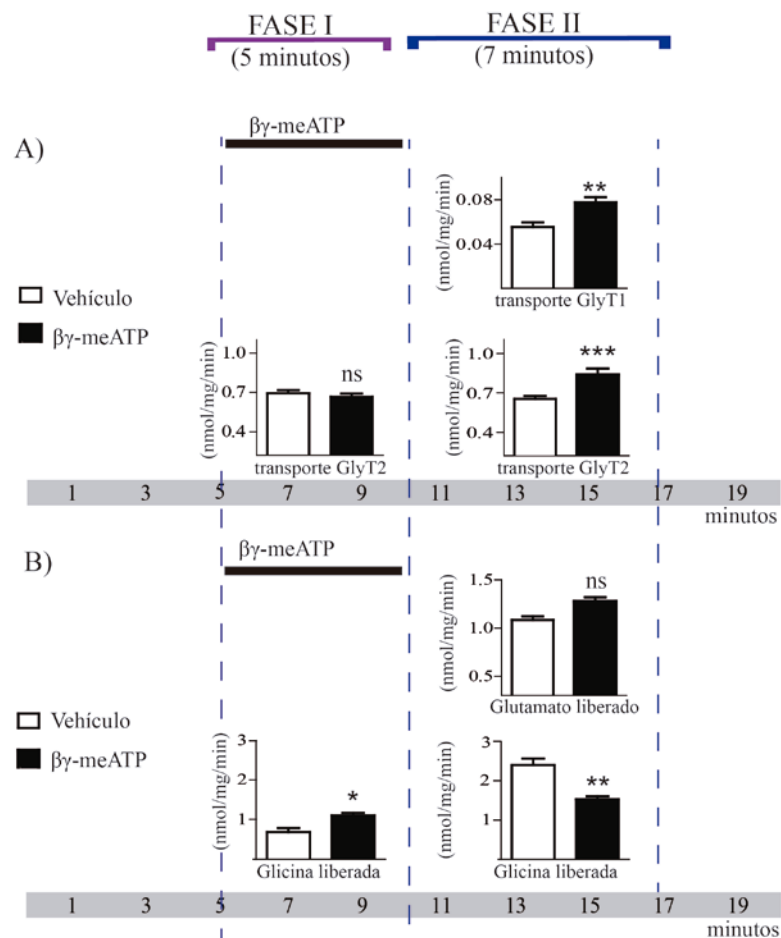
N: 3 experimentos; tres réplicas por experimento.

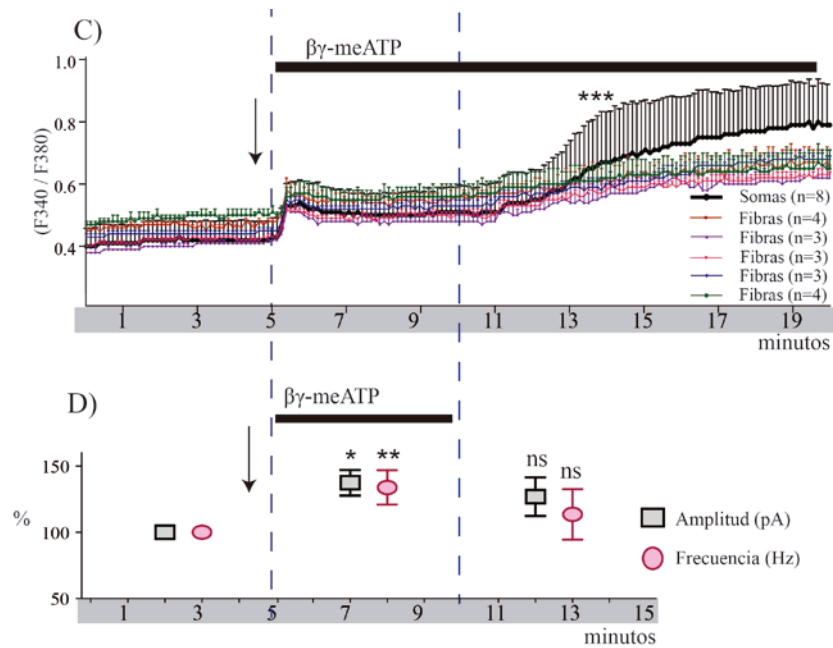
**Figura 14. Cultivos primarios neuronales infectados con shRNAi para P2X2 y para P2X3.** (A) Los cultivos primarios se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 120.000 células/cm<sup>2</sup> y 24 h después se infectaron con shRNAi. A los 16 DIV se realizó el experimento de medida de la actividad de GlyT2 durante 7 min, tras un tratamiento previo de 5 min a 37°C con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M o con su vehículo (PBS) según se indica. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,0005$  mediante prueba de *t*-Student. (B) La disminución de la expresión del receptor se detectó mediante inmunodetección con anticuerpo anti-

P2X2 y anti-P2X3, se normalizó por la cantidad relativa de  $\beta$ -III-tubulina. Se confirmó la expresión de la proteína interferente viral por la expresión de GFP y, con anticuerpo anti-GlyT2 la expresión del transportador. \*\*: Diferencia con respecto al control  $p < 0,005$  mediante prueba de  $t$ -Student.

## 5. EFECTO DE $\beta$ meATP SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA.

El hecho de que el receptor P2X3 y el transportador GlyT2 se localicen en células diferentes nos indica que la regulación estudiada es paracrina, por lo que es necesaria la presencia de algún mensajero entre ambas neuronas. Por este motivo nos propusimos caracterizar lo otros parámetros de nuestro cultivo ante la estimulación con  $\beta$  $\gamma$ -meATP. Para ello, se analizó el efecto de este agonista sobre la actividad del transportador glial de glicina GlyT1, así como sobre la liberación de los neurotransmisores glicina y glutamato. También, se estudiaron las variaciones de calcio citosólico en neuronas mediante microfluorimetría y, finalmente, la actividad postsináptica de receptores de glicina midiendo mediante técnicas de electrofisiología las corrientes postsinápticas inhibitoras (sIPSCs) glicinérgicas en respuesta al tratamiento con  $\beta$  $\gamma$ -meATP (figura 15).





**Figura 15. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP en cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal.** Los cultivos primarios de 16 DIV se trataron durante 5 min con  $\beta\gamma$ -meATP (Fase I), posteriormente se eliminó el tratamiento y sin lavar, se midió la actividad de interés durante los 7 min posteriores (Fase II). **(A) Actividad de transporte de GlyT1 y de GlyT2.** El primer histograma, representa la actividad del transportador GlyT1 durante los 7 minutos posteriores al tratamiento con vehículo (PBS) y con  $\beta\gamma$ -meATP. Los histogramas inferiores de A, representan la actividad de transporte de GlyT2 durante los primeros 5 min de tratamiento con el agonista/vehículo y en los 7 min posteriores al tratamiento con vehículo/ $\beta\gamma$ -meATP. N = 10 experimentos con triplicados. **(B) Liberación de glutamato y de glicina tras la estimulación con  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios se sembraron en placas multipocillo. A los 16 DIV, se cargaron las células con neurotransmisor tritiado (o marcado con tritio) 30 min en agitación. Tras la carga, los cultivos se lavaron durante 20 min en agitación. A continuación se añadió el vehículo (PBS) o el agonista  $\beta\gamma$ -meATP. Este medio se recuperó para medir la cantidad de tritio liberada durante estos 5 min. Sobre el cultivo sin lavar, se añadió medio PBSc-glucosa NFPS 10 $\mu$ M durante 7 min y, posteriormente, se recolectó para medir la radiactividad liberada durante este segundo periodo. El primer histograma de este apartado, corresponde al glutamato liberado tras los 7 min posteriores al tratamiento. En la parte inferior se representa la glicina liberada durante los 5 min de tratamiento con vehículo y con  $\beta\gamma$ -meATP y a continuación, la glicina liberada durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*, \*\*\* Diferencias con respecto a su control  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0001$ , mediante prueba de *t*-Student. N = 3 experimentos con triplicados. **(C) Razón de fluorescencia de somas y axones neuronales.** Las neuronas de 16 DIV sembradas en cubres, se incubaron con la sonda fluorescente Fura2-AM, tras medir la razón de fluorescencia basal durante 5 min, se añadió el agonista  $\beta\gamma$ -meATP y se midió la razón de fluorescencia 340/380 de axones y somas del cultivo. Por limitaciones técnicas, en este caso el

agonista estuvo presente en el cultivo desde su aplicación hasta el fin de la toma de medidas. \*\*\* Diferencia  $p < 0,001$  mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni. **(D) Medida de las corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas (sIPSCs).** Los cultivos primarios neuronales se sembraron en cubres y se registraron mediante técnicas de electrofisiología (*Voltage-Clamp*) en presencia DNQX 10 $\mu$ M, AP-5 10 $\mu$ M y bicuculina 3 $\mu$ M para detectar las sIPSCs glicinérgicas en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP. Tras establecer una línea base durante los primeros 5 min las neuronas fueron estimuladas durante 5 min con  $\beta\gamma$ -meATP. Tras retirar el agonista, se continuó el registró de sIPSCs durante los 7 min posteriores. Por último, se añadió estricnina para confirmar el componente glicinérgico de la respuesta medida (este último control no se muestra en la gráfica). \*, \*\* Diferencia  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  mediante *t* test de muestras desapareadas de *Welch*. N = 7

Los datos de transporte de glicina nos indican que durante los primeros minutos no hay cambios en la actividad de GlyT2. Sin embargo, tras 5 minutos de tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP, tanto la actividad de GlyT2, como la actividad de GlyT1, aumentan de manera significativa un  $27,92 \pm 7,15\%$  y un  $40,31 \pm 10,91\%$ , respectivamente (figura 15A). Estos datos sugieren que tras la adición de  $\beta\gamma$ -meATP, se induce la recaptura de glicina tanto neuronal como glial.

El análisis de la liberación de neurotransmisor glutamato tras 5 minutos de tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP, presentaba un aumento no significativo de  $17,52 \pm 5,44\%$  (figura 15B). Las variaciones en la liberación de neurotransmisor glicina se analizaron en dos tiempos: durante los primeros 5 minutos, se registró un aumento de la liberación de glicina de  $60,87 \pm 14,61\%$  con respecto al control sin agonista. A este periodo lo denominamos fase I. Sin embargo, en los minutos posteriores, la liberación de este neurotransmisor inhibitor descendió un  $36,32 \pm 7,40\%$  con respecto al control sin tratamiento (denominada fase II).

En experimentos de medida de calcio citosólico (figura 15C) se advirtió que la estimulación de los receptores P2X3 con  $\beta\gamma$ -meATP producía una respuesta rápida en las células registradas, y a los 5 minutos postratamiento, hubo un aumento significativo en la razón de fluorescencia en los somas de aquellas neuronas que respondían al agonista. Las fibras de estos somas no experimentaron variaciones significativas (tabal 1).

	Basal			Fase II			"Bonferroni posttests": Basal vs Fase II				
	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Difference	95% CI of diff.	t	P value	Summary
somas	0,51	0,02	8	0,70	0,08	8	0,28	0,149 - 0,410	6,397	$P < 0,001$	***
fibras: 16, 19, 22 y 23	0,55	0,01	4	0,63	0,03	4	0,16	-0,024 - 0,344	2,585	$P > 0,05$	ns
Fibras: 8, 10 y 13	0,48	0,02	3	0,58	0,04	3	0,18	-0,033 - 0,393	2,518	$P > 0,05$	ns
Fibras: 11, 12 y 14	0,49	0,01	3	0,59	0,03	3	0,17	-0,043 - 0,383	2,378	$P > 0,05$	ns
Fibras: 15, 18 y 21	0,52	0,01	3	0,63	0,04	3	0,19	-0,023 - 0,403	2,658	$P > 0,05$	ns
Fibras: 17, 20, 24 y 25	0,55	0,01	4	0,63	0,02	4	0,14	-0,044 - 0,324	2,262	$P > 0,05$	ns

**Tabla 1: Resultados estadísticos Figura 15C.** Análisis de los valores de fluorescencia de las fibras y

somas de neuronas de médula espinal, se calculó el promedio de valor de fluorescencia durante el registro inicial de actividad de calcio basal y se comparó con el promedio de fluorescencia en las dos fases descritas fase I (momento de adición del agonista y 5 min) y fase II (7 min posteriores). En la fase II, se detectó un aumento de calcio citosólico estadísticamente significativo en los somas de las neuronas. \*\*\*  $p < 0,001$  mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni. Para el análisis se agruparon las fibras que tenían una razón de fluorescencia similar.

Por último, quisimos analizar la respuesta glicinérgica postsináptica ante la adición de  $\beta\gamma$ -meATP (figura 15D). Esta técnica, necesita una gran batería de reactivos para el análisis de las sIPSCs, estos reactivos no interfieren en la liberación de neurotransmisor, y permite la respuesta inicial de calcio por  $\beta\gamma$ -meATP. Sin embargo, en presencia de estos inhibidores no se produce el aumento de actividad del transportador GlyT2 ni el aumento de calcio citosólico posterior, por lo que solo hemos tenido en cuenta los resultados de la denominada fase I de este experimento. En la fase I lo que se observa es un aumento de las sIPSCs glicinérgicas tanto en amplitud ( $38,38 \pm 9,63\%$ ) como en frecuencia ( $33,83 \pm 13,02\%$ ) respecto a la fase control, lo que concuerda con el incremento en la liberación de glicina en la fase I que se muestra en la figura 15B. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la activación de fibras nociceptivas P2X3 de lugar a la excitación neuronal y la despolarización de neuronas próximas, incluidas, las interneuronas glicinérgicas.

Con estos resultados, hemos descrito el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria en dos fases. Una fase inicial, sería la denominada fase I, que transcurre durante los cinco primeros minutos de tratamiento con el agonista en el que hay una respuesta de calcio general en las células, en la que hay un aumento en la liberación de glicina y de corrientes inhibitorias mediadas por este neurotransmisor, lo que podría interpretarse como una despolarización de las interneuronas glicinérgicas. A continuación, comenzaría la que hemos denominado fase II: donde se produce un aumento del calcio intracelular en los cuerpos neuronales; además, en esta segunda fase, hay un leve aumento de liberación de neurotransmisor excitador glutamato y una disminución significativa de la liberación de glicina a la vez que los transportadores GlyT1 y GlyT2 recapturan el NT inhibitorio del medio de forma activa.

## **6. ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN ENTRE P2X3 y GlyT2.**

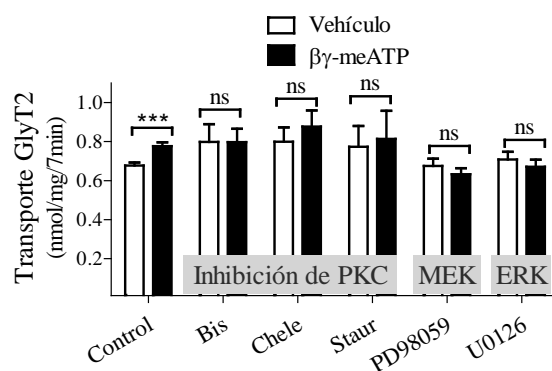
*In vivo*, los receptores P2X3 se encuentran localizados en las neuronas de los DRG cuyos procesos constituyen las fibras sensoriales. Sin embargo, GlyT2 está exclusivamente localizado en interneuronas glicinérgicas. No hay colocalización celular entre ambas proteínas (figura 2)

por lo tanto, las cascadas de señalización que afectan a la regulación de GlyT2 por P2X3 pueden generarse en la fibra sensorial o en la interneurona glicinérgica.

En la figura i11, hemos realizado una revisión en forma de esquema donde se ha descrito los diferentes aspectos de la maquinaria de señalización asociada a la actividad de los receptores P3X3 resumiéndola en tres cascadas: (1) endocitosis y transporte retrogrado del transportador mediando por MAPK; (2) movilización de calcio y fusión de vesículas sinápticas; y (3) aumento de la presencia de receptores purinérgicos en membrana.

### 6.1.- VÍA DE LAS MAPK – CREB.

La activación de los receptores P2X3, pone en marcha una cascada de quinasas que implica la endocitosis y transporte del receptor al soma de la neurona sensorial. En esta endocitosis y transporte retrógrado participan: PKC, endosomas tardíos marcados con Rab7, P2X3, H-Ras, ERK y MEK (Chen, Wang et al. 2012). Para averiguar si esta vía de señalización está implicada en el proceso de regulación descrito, se realizaron experimentos de transporte en presencia de distintos inhibidores de las MAPK (figura 16).



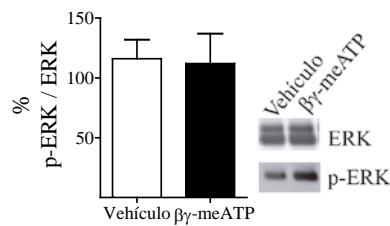
N = 5 – 8 experimentos con triplicados.

**Figura 16. Efecto de βγ-meATP sobre GlyT2 en presencia de inhibidores MAPK.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 30 min con los inhibidores: bisindolilmaleimida (Bis) 0.5μM; queleritina (Chel) 0.7μM; estaurosposina (Staur) 1μM; PD98059 50μM y U0126 10μM; o con PBS sin inhibidores en el caso del control. A continuación se trataron 5 min, a 37°C con vehículo (PBS) o con βγ-meATP 10μM. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo p<0,0001, mediante prueba de *t*-Student.

Los resultados obtenidos, indican que es necesaria la actividad de PKC, de MEK y de ERK, por lo que parece posible que la regulación de GlyT2 requiera la endocitosis del receptor P2X3 y su actividad en el soma de la neurona sensorial. Sin embargo, las MAPK participan en muchas otras vías de señalización celular, por lo que son necesarios más abordajes si queremos

confirmar que la internalización del receptor es necesaria para que se active GlyT2 en la interneurona próxima a la fibra sensorial.

Se ha descrito que hay un aumento de ERK fosforilado (p-ERK) y de CREB fosforilado (p-CREB) en las fibras sensoriales tras la estimulación y endocitosis de P2X3 (Chen, Wang et al. 2012). Mediante experimentos de inmunodetección se hizo una cuantificación comparativa de la cantidad de p-ERK en cultivos control y cultivos tratados con  $\beta\gamma$ -meATP (figura 17).



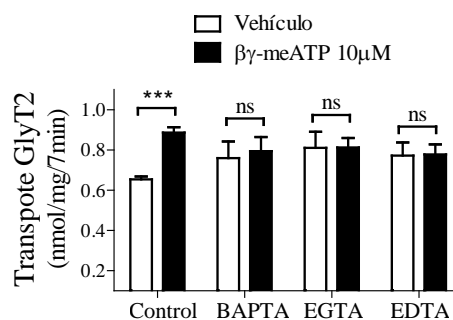
N= 2 experimentos; dos réplicas por experimento.

**Figura 17. Cuantificación de pERK/ERK en lisados neuronales.** Los cultivos neuronales fueron tratados con  $\beta\gamma$ -meATP o con vehículo (PBS) en el caso del control. Las células se lisaron y las proteínas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-ERK y anti-p-ERK. p-ERK se reveló con un anticuerpo conjugado con peroxidasa, mientras que ERK se reveló con un anticuerpo fluorescente para descartar la superposición de la señal. Los valores mostrados en el histograma corresponden a la media  $\pm$  SEM de la relación detectada de p-ERK / ERK. Los datos se analizaron por densitometría mediante Quantity One – 4.6.3 (Basic).

En las condiciones experimentales utilizadas, no se detectó un aumento de esta quinasa activa, lo que hace poco probable que esta sea la vía de señalización implicada.

## 6.2.- CALCIO Y CANALES DE CATIONES.

El calcio es la primera señal del receptor P2X3, por lo que es imprescindible confirmar que el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2 es dependiente de calcio, para ello se realizaron experimentos de transporte en presencia de distintos quelantes (figura 18). Todos los quelantes de calcio revierten el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2.



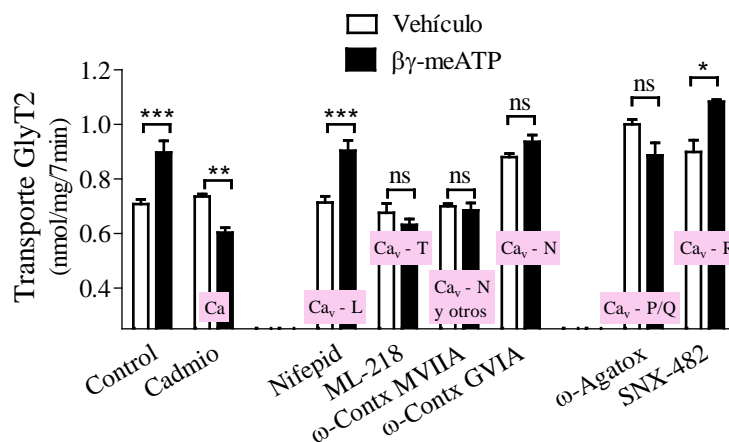
N = 3 – 6 experimentos; tres réplicas por experimento.

**Figura 18. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transporte de GlyT2 en ausencia de calcio.** Los cultivos



primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron incubados durante 10 min con agentes quelantes de calcio intracelular: BAPTA-AM 10 $\mu$ M y extracelular: ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) 100 $\mu$ M y ácido etilenglicol-tetraacético (EGTA) 100 $\mu$ M. A continuación se trataron 5 min a 37°C con vehículo (PBS) o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M. En la situación control no se utilizó ningún quelante. La actividad del transportador se midió durante los 7 minutos posteriores al tratamiento. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,0001$ , mediante prueba de  $t$ -Student

Asumiendo el papel principal de P2X3 como primer canal de calcio, comprobamos la posible implicación de otros canales de calcio dependientes de voltaje (figura 19).



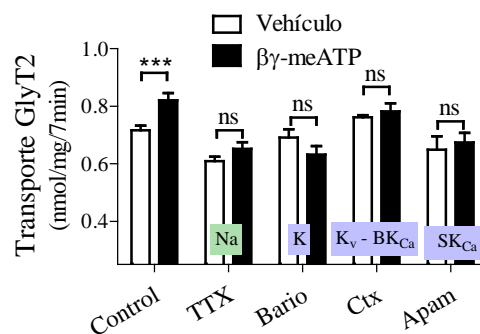
N = 3 – 5 experimentos; tres réplicas por experimento.

**Figura 19. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transporte de GlyT2 en presencia de inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje  $Ca_v$ .** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal se incubaron durante 10 min con diferentes inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje y a continuación con vehículo (PBS) o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M otros 5 min a 37°C. En paralelo, se realizó un control en ausencia de inhibidores. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  mediante prueba de  $t$ -Student.

La inhibición general de canales de calcio con cadmio provoca un efecto inhibitorio de  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transporte de GlyT2 de  $17,98 \pm 2,74\%$ . En la figura 19 se agrupan los resultados de la inhibición de canales  $Ca_v$  presentes en fibras nociceptivas, que son: “ $Ca_v$  L” (activados por alto voltaje), “ $Ca_v$  T” (activados por bajo voltaje) y “ $Ca_v$  N” (activado por alto voltaje) (Lee 2013). Los antagonistas de  $Ca_v$  T (ML-218 100 $\mu$ M) y de  $Ca_v$  N ( $\omega$ -conotoxina MVIIA 1 $\mu$ M y  $\omega$ -conotoxina GVIA 0.5 $\mu$ M), inhiben la señalización de  $\beta\gamma$ -meATP. Estos canales están localizados en el terminal presináptico de fibras C y regulan la liberación de glutamato y otros péptidos en las astas dorsales de la médula espinal (Jacus, Uebele et al. 2012). La nifepidina 10 $\mu$ M bloquea los canales tipo L que se encuentran en todas las células excitables y en la mayoría de las

células no excitables, estos canales no participan en la señalización de  $\beta\gamma$ -meATP. Por otro lado, el uso  $\omega$ -agatoxina IVA 0,5 $\mu$ M revela que también están implicados canales de calcio dependientes de voltaje P/Q (activados por alto voltaje). Estos canales son los más ampliamente distribuidos en el SNC de mamíferos; son responsables de la liberación de neurotransmisores en la zona activa de la presinapsis (Bertolino and Llinas 1992). Los canales  $Ca_v$  R se expresan en diversos tejidos y tipos celulares y no participan en la señalización, ya que como vemos  $\beta\gamma$ -meATP provoca un aumento estadísticamente significativo de la actividad del transportador ( $20,47 \pm 7,09\%$ ) en presencia del inhibidor SNX-482 0,1 $\mu$ M, aunque este aumento es menor que en la situación control en ausencia de inhibidores ( $26,82 \pm 6,40\%$ ).

La necesidad de la función de canales de calcio activados por bajo y alto voltaje nos planteó la posibilidad de que la actividad de P2X3 desencadenara la generación de potenciales de acción, por lo que lo siguiente fue estudiar los efectos de otros canales necesarios en la producción y mantenimiento de un pA (figura 20).



N = 3 experimentos; tres réplicas por experimento.

**Figura 20. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transporte de GlyT2 en presencia de inhibidores de canales de sodio y canales de potasio.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 10 minutos con inhibidores de canales de  $Na^+$  – TTX 0,25 $\mu$ M – de  $K^+$  – bario 600 $\mu$ M; caribdotoxina 0,2 $\mu$ M (Ctx); apamina 1 $\mu$ M (Apam) – o sin inhibidores en la situación control. A continuación se trataron durante 5 minutos a 37°C con vehículo (PBS) o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M. La actividad del transportador se midió durante los 7 minutos posteriores al tratamiento. \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,001$  mediante prueba de *t*-Student.

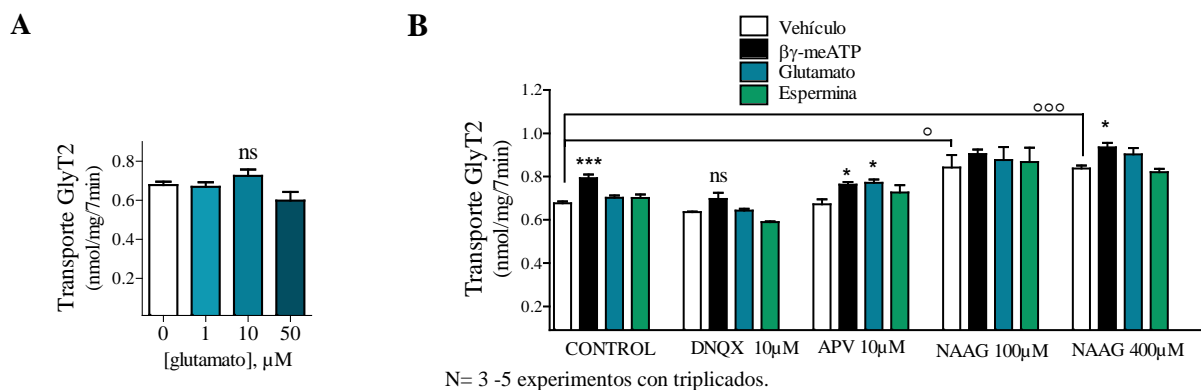
La tetrodotoxina (TTX) bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje tipo 1.6, impidiendo la propagación del pA y además revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. Sin embargo, esta toxina no inhibe a los canales de sodio de fibras sensoriales nociceptivas (Lee 2013) por lo que es necesaria la despolarización de una neurona no nociceptiva para que aumente el transporte de GlyT2. La inhibición general de los canales de potasio con bario, impide la activación del transportador por  $\beta\gamma$ -meATP. Con caribdotoxina (Ctx) inhibimos los canales de K dependientes

de voltaje ( $K_v$ ) y los dependientes de calcio de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ). La apamina bloquea los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia ( $SK_{Ca}$ ), estos canales recuperan el potencial de reposo de las neuronas tras un pA y en todos los casos su inhibición impide el aumento de actividad de GlyT2 por  $\beta\gamma$ -meATP. Con estas premisas proponemos que la señalización entre fibra sensorial e interneurona inhibidora glicinérgica, ocurre a través de una molécula o neurotransmisor liberado desde la fibra sensorial a consecuencia de un aumento de calcio intracelular en la misma, esta molécula o neurotransmisor provocaría la despolarización de la segunda neurona que podría ser, entre otras, la interneurona glicinérgica.

### 6.3.- LIBERACIÓN DE VESÍCULAS SINÁPTICAS: GLUTAMATO Y GLICINA.

En 2001 trabajos del laboratorio, describieron que la despolarización de neuronas glicinérgicas en presencia de calcio conlleva la llegada a membrana del transportador GlyT2 en un proceso de exocitosis de vesículas sinápticas, lo que revela una íntima relación entre el proceso de liberación y recaptación del NT glicina. Este fenómeno, viene seguido de una fase rápida de internalización del transportador (Geerlings, Nunez et al. 2001). El efecto descrito por la activación de P2X3 con  $\beta\gamma$ -meATP podría ser explicado por la despolarización de la interneurona glicinérgica debido a la llegada de glutamato desde la fibra sensorial.

En la figura 15B se observa que la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP produce liberación de glutamato, lo que está también descrito en la bibliografía (Kumar, Cherkas et al. 2012). Por ello, hemos analizado los efectos del glutamato sobre el transporte de GlyT2 en los cultivos neuronales utilizados (figura 21A), así como el papel que los receptores de glutamato pudieran tener en la activación del transportador (figura 21B).

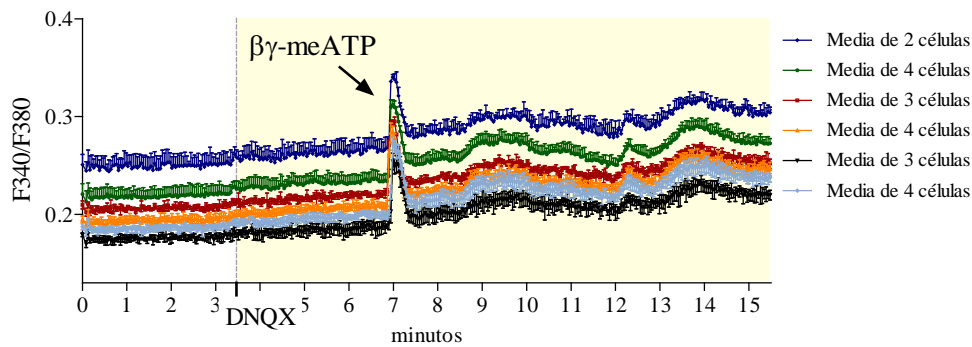


**Figura 21. Actividad de GlyT2 en presencia de agonistas y antagonistas de receptores de glutamato y reversión del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 10 min con (A) distintas concentraciones de glutamato (0, 1, 10 y 50 $\mu$ M) o (B) con antagonistas de receptores de glutamato: DNQX 10 $\mu$ M, AP5 10 $\mu$ M, NAAG 100 y 400 $\mu$ M. A continuación se trataron 5 min a 37°C con el agonista de P2X3  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M o con activadores de receptores de

glutamato: glutamato 10 $\mu$ M y espermina 1mM. La situación control corresponde a los efectos de los agonistas en ausencia de antagonistas. La actividad del transportador se midió durante 7 min tras los tratamientos. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni: \*, \*\*\* diferencia con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ . Los efectos de cada uno de los antagonistas se analizaron mediante el ANOVA de un factor, test de Tukey con respecto al control sin antagonista y con vehículo °, °°° diferencia con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0005$ .

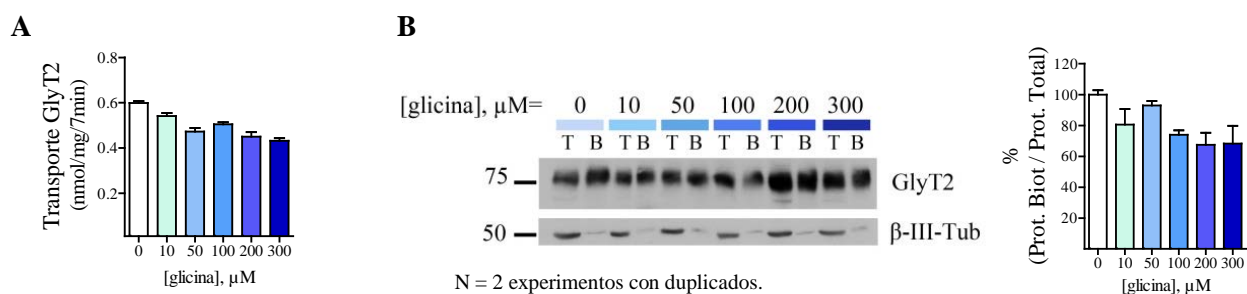
No se han detectado cambios significativos en el transporte de GlyT2 tras el tratamiento con glutamato ( $4,03 \pm 5,12\%$ ) o con el agonistas de NMDAR espermina. El antagonista DNQX (6,7-dinitro-quinoxalino-2,3-diona), revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, lo que indica que los receptores AMPA/kainato son necesarios para el aumento de la actividad del transportador. Sin embargo, el bloqueo de los receptores de glutamato NMDA, no revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2, aunque si lo minimiza, pasando de un  $17,18 \pm 1,79\%$  de activación de GlyT2 en la situación control a  $11,10 \pm 1,72\%$  cuando se utiliza el agonista en presencia de APV (ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico). Además se utilizó el neurotransmisor endógeno N-acetilaspartilglutamato (NAAG) que es un agonista de mGlu3R a concentraciones menores o iguales a 100 $\mu$ M. A mayor concentración, el NAAG, también actúa como antagonista de los receptores NMDA. La activación de receptores metabotrópicos de glutamato mGlu3 con NAAG 100 $\mu$ M y NAAG 400 $\mu$ M estimula el transporte de GlyT2 un  $24,45 \pm 8,65\%$  y  $23,79 \pm 3,25\%$  respectivamente, sin embargo, a 100 $\mu$ M de NAAG, se pierde el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, y a 400 $\mu$ M de NAAG el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre actividad de GlyT2 sólo es de un  $11,65 \pm 2,54\%$ .

Algunos de los antagonistas aquí analizados son reactivos utilizados en el registro de las sIPSCs glicinérgicas, y vemos que en presencia de DNQX no se produce el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre GlyT2. Para comprobar si este antagonista actúa impidiendo la activación de P2X3 por  $\beta\gamma$ -meATP o en pasos posteriores, se realizaron experimentos de microfluorimetría de calcio en neuronas estimuladas con el agonista en presencia de DNQX (figura 22). El antagonista de AMPA/Kainato, se añadió a los 3,5 min de empezar a medir la razón de fluorescencia de las células cargadas con Fura-2AM. Vemos que la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP en el minuto 6,8 activa sutilmente a P2X3 y no se observa el aumento de calcio posterior a los 5 min de la estimulación que veíamos en la figura 15C (minuto 13,8 del registro de figura 22: fase II). Concluimos que el uso de DNQX permite la activación de P2X3 pero la minimiza (figura 15), por esta razón, en el análisis de las sIPSCs, solo se han tenido en cuenta los datos de la descrita fase I del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.



**Figura 22. Microfluorimetría de calcio en cultivos primarios neuronales.** Las neuronas se sembraron sobre cubres con PDL; a los 16 DIV, se incubaron con la sonda fluorescente Fura 2-AM y se registró la variación de la razón de fluorescencia (ratio F340/F380). Se muestran el ratio de neuronas en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M en presencia de DNQX 10 $\mu$ M (antagonistas de receptores AMPA/Kainato). Cada trazo corresponde a la media de fluorescencia de varios somas.

Como se muestra en la figura 15B, la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP también conlleva una liberación del neurotransmisor glicina durante los primeros minutos, aunque seguidamente ésta disminuye de forma significativa. Sabemos que varios transportadores de neurotransmisores son regulados por su propio sustrato (Whitworth and Quick 2001, Begni, Tremolizzo et al. 2005). En el caso de GlyT2, la presencia de sodio, cloruro y glicina genera variaciones conformacionales como el desplazamiento del segundo bucle extracelular entre otras (Lopez-Corcuera, Nunez et al. 2001). Esto nos llevó a analizar los efectos de la aplicación de glicina e iones sobre el cultivo mediante experimentos de transporte y biotilación.



**Figura 23. Efecto del sustrato glicina sobre la actividad y la presencia en membrana de GlyT2.** Los cultivos primarios neuronales fueron tratados durante 10 min con distintas concentraciones de glicina en PBS1Xc a 37°C. (A) Se midió la actividad del transportador durante los 7 min posteriores al tratamiento. (B) Cuantificación relativa de proteína en membrana mediante biotilación: tras los distintos tratamientos las proteínas de superficie se marcaron con el reactivo sulfo-NHS-biotina, a continuación las células se lavaron y se lisaron; las proteínas marcadas se aislaron con estreptavidina inmovilizada y las muestras se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GlyT2 y anti- $\beta$ -III-tubulina. El histograma representa la relación de GlyT2 en la fracción de proteína de superficie biotilada (B) con la

fracción de proteína total (T). Los datos se analizaron por densitometría mediante Image Lab Software 5.5 – BioRad.

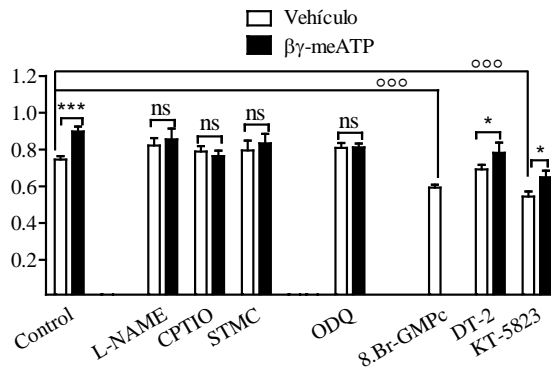
A dosis crecientes de glicina (figura 23A), se observa una tendencia negativa de la actividad de transporte de GlyT2 que no llega a ser significativa. Igualmente, en el marcaje de proteína de membrana (figura 23B) vemos que hay una disminución progresiva de la cantidad de transportador GlyT2.

Puesto que ni el glutamato ni la glicina han reproducido los efectos que se han descrito sobre la actividad y expresión de GlyT2 al tratar los cultivos con  $\beta\gamma$ -meATP, se exploraron otras posibilidades para encontrar el mensajero que actúa sobre la interneurona glicinérgica.

#### **6.4.- ÓXIDO NÍTRICO (ON).**

La neurotransmisión glutamatérgica se ha relacionado frecuentemente con la producción de óxido nítrico (ON) (Contestabile 2000, Esplugues 2002), y el ON es capaz de modular la neurotransmisión glicinérgica (Yu and Eldred 2005). Además, en el SNC el ATP y el ON coexisten en los mismos tejidos (Belai and Burnstock 1994) y participan en las mismas funciones desencadenando efectos tóxicos o protectores en función de su concentración (Florenzano, Viscomi et al. 2008). A esto se suma, que trabajos previos del laboratorio han demostrado que los receptores P2Y pueden modular la actividad de GlyT2 mediante la vía del ON – GMPc (Jimenez, Zafra et al. 2011). Estos antecedentes hacían necesario un estudio del papel del ON en la regulación entre P2X3 y GlyT2.

En la figura 24, vemos agrupados los resultados de inhibición de la síntesis de ON con reactivos como L-NAME, análogo de arginina que inhibe la síntesis de ON y a la NOS; CPTIO que reacciona con el óxido nítrico formando un complejo carboxyl-CPT (carboxi-fenil-tetrametil-imidazolina) que también inhibe a NOS; y STMC (antagonista de nNOS). En todos los casos, se impide la activación del  $29,59 \pm 4,41\%$  de GlyT2 en respuesta a  $\beta\gamma$ -meATP. La inhibición de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) con ODQ, que también revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP; esta enzima es la principal diana del ON y su activación implica un aumento de GMPc. El GMPc activa a la kinasa PKG I o PKG-II, responsable del mantenimiento del ciclo exoendocítico (Collado-Alsina, Ramirez-Franco et al. 2014).



N = 6 – 12 experimentos con triplicados.

**Figura 24. Efecto de  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transporte de GlyT2 en presencia de inhibidores de NOS.**

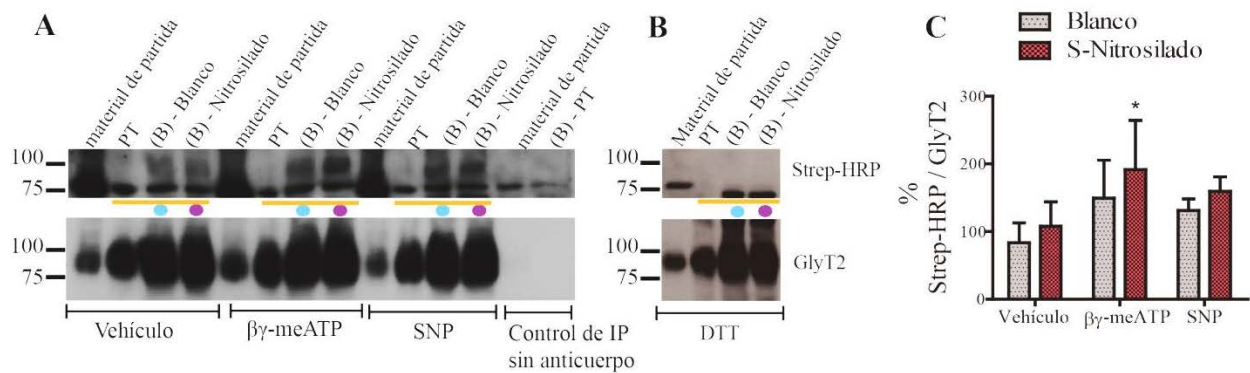
**Ruta de ON – GMPc.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 10 min con moduladores de la ruta del óxido nítrico: L-NAME 100 $\mu$ M; CPTIO 100 $\mu$ M; STMC 2 $\mu$ M; ODQ 1 $\mu$ M; 8-Br-GMPc 500 $\mu$ M; DT-2 0,3 $\mu$ M; KT-5823 1 $\mu$ M. A continuación, las muestras se trataron 5 min a 37°C con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M o vehículo (PBS). El control corresponde al efecto del agonista en ausencia de inhibidores. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\*\* Diferencia con respecto a vehículo en presencia del inhibidor correspondiente en cada caso,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ , mediante prueba de *t*-Student. Los efectos de cada uno de los inhibidores se analizaron mediante el test de Tukey con respecto al control sin antagonista y con vehículo: °°° diferencia con respecto al control con vehículo  $p < 0,001$ .

A pesar de que parece necesaria la presencia y síntesis de ON para que  $\beta\gamma$ -meATP active a GlyT2, los segundos mensajeros de la vía de señalización del ON–GMPc, inhiben al transportador, como vemos con el uso de 8-Br-GMPc ( $-20,45 \pm 2,15$ ). Además la ni inhibición de PKG-I con DT-2, ni de PKG-II con KT5822, impiden el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP que en cada caso incrementa el transporte un  $20,45 \pm 2,15\%$  y un  $22,95 \pm 3,62\%$ . La inhibición PKG-II disminuye de forma significativa la actividad del transportador un  $22,95 \pm 3,62\%$ , lo que está de acuerdo con la importancia del ciclo exoendocítico en el buen funcionamiento de GlyT2. Estos resultados demuestran que la inhibición de la vía de síntesis del ON, revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. Sin embargo, los mensajeros resultantes de la cascada de GMPc tienen un efecto inhibitor sobre la actividad del transportador. Este efecto inhibitor del GMPc ya fue descrito en nuestro laboratorio (Jimenez, Zafra et al. 2011).

El ON no solo actúa a través de la ruta del GMPc, además puede reaccionar con las proteínas modificando la actividad de las mismas (figura i7: S-nitrosilación y la nitración de tirosinas). Distintos factores como la concentración o la presencia de especies reactivas de oxígeno entre otros, determinan qué señalización desencadenará la molécula. De esta manera, se han descrito funciones contradictorias de este gas como promover la supervivencia y también la

muerte celular, así como efectos tanto pro-nociceptivos (De Alba, Clayton et al. 2006, Guan, Yaster et al. 2007) como analgésicos (Paoloni, Appleyard et al. 2003).

GlyT2 tiene 22 cisteínas, algunas de las cuales podrían ser susceptibles de S-nitrosilación. Además interacciona directamente con Sintaxina 1A (Geerlings, Lopez-Corcuera et al. 2000), una proteína de membrana que conduce a la exocitosis y que se regula por nitrosilación (Palmer, Duncan et al. 2008), por lo que el ON podría reaccionar directamente con el transportador o con las proteínas que interaccionan con el mismo. Con el uso de agentes de unión específica a grupos tiol, se analizó la cantidad de GlyT2 nitrosilado en un lisado de médula espinal control tratado con vehículo (PBS), y se comparó con el nivel de nitrosilación en lisados tratados con  $\beta\gamma$ -meATP, con el donador de ON nitroprusiato sódico (SNP) y tratado con DDT (figura 25).



N= 2 experimentos con duplicados.

**Figura 25. Detección de S-nitrosilación en GlyT2 de médula espinal de rata.** La médula espinal de rata se disgrega en oscuridad y en presencia de neocuproina (agente protector de grupos nitrosilados), y se divide en cuatro muestras que fueron tratadas con vehículo (PBS),  $\beta\gamma$ -meATP, SNP o DTT según se indica. Tras el tratamiento, los grupos tiol libres (SH) se bloquearon con NEM. Después de saturar el exceso de NEM con lisina, cada muestra se dividió en dos: una como blanco (●), y otra a la que se le añadió ascorbato sódico (●) para reducir los grupos SH – nitrosilados. Por último, estos grupos fueron marcados con de BMCC-biotina (B), y después se inmunoprecipitó cada muestra con anti-GlyT2 (—) y se reveló con estreptavidina-HRP para detectar solo aquella fracción de GlyT2 con grupos SH modificados por nitrosilación. Esta misma membrana se reveló con anti-GlyT2 y se estableció la relación entre GlyT2 biotinilado / GlyT2 total para comparar la señal del blanco y nitrosilado en cada tratamiento. (A) Detección de BMCC-biotina con estreptavidina-HRP y detección de GlyT2 en la muestra de partida de lisado medular, en la fracción de proteína total inmunoprecipitada con antiGlyT2 (PT), y en la fracción de proteína biotinilada (B) e inmunoprecipitada con anti-GlyT2 (—) de cada uno de los tratamientos realizados sobre el precipitado de médula espinal (blanco: ● y ascorbato sódico: ●), (B) Detección de BMCC-biotina con estreptavidina-HRP y detección de GlyT2 en la muestra previamente reducida con DTT (C) Los valores mostrados en el histograma corresponden a la media  $\pm$  SEM de la

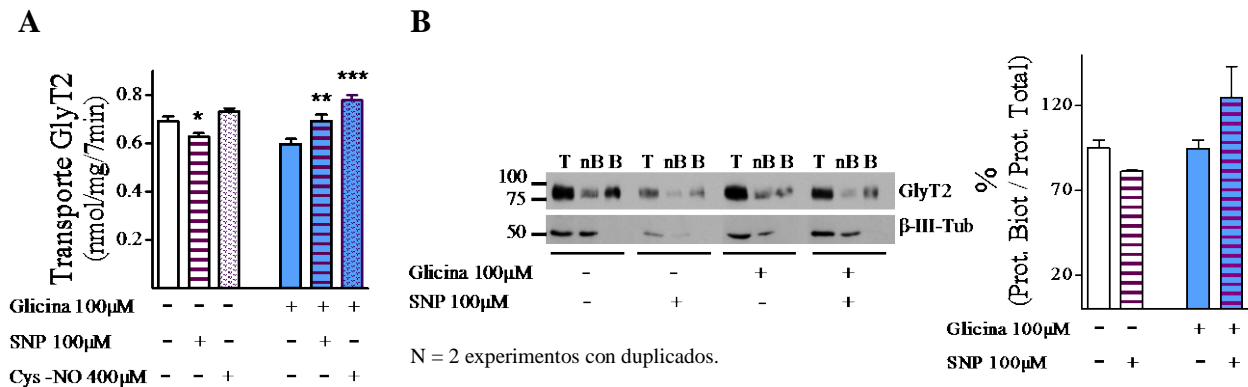


relación detectada de estreptavidina / GlyT2. \* Diferencia con  $p < 0,05$ , mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni.

Los resultados mostraron una unión inespecífica de la biotina, ya que en la fracción de blanco (●), donde los grupos tiol han sido bloqueados, se observa señal con estreptavidina-HRP. Sin embargo, en la fracción de proteína nitrosilada (●) la señal es mayor, por lo que atribuimos este aumento a grupos SH nitrosilados que han quedado libres con la reducción con ascorbato. Este aumento de la señal en la fracción nitrosilada es del  $24,14 \pm 36,21\%$  en el control sin tratamiento, del  $42,25 \pm 72,84\%$  en la muestra tratada con  $\beta\gamma$ -meATP, y  $28,34 \pm 21,19\%$  en la tratada con SNP. Se realizó un control adicional, en este caso se redujo la muestra con un pretratamiento con DTT para que todas las cisteínas quedaran libres y se bloqueara toda la muestra. Así, en este caso, detectamos señal de GlyT2, pero no hay señal de grupos marcados con biotina en el revelado con estreptavidina-HRP (figura 25B). Este resultado demuestra que las cisteínas libres se bloquean con NEM, y sugiere que algunas de las cisteínas están modificadas (nitrosilación, palmitoilación) o interaccionando con algo durante el bloqueo, pero que posteriormente quedan libres durante el proceso del experimento. Estos resultados avalan que GlyT2 es susceptible de nitrosilación y que la activación de P2X2/3 y P2X3 con  $\beta\gamma$ -meATP podría conllevar una modificación del transportador por S-nitrosilación, por lo que en este caso, el ON pondría en marcha una vía de señalización distinta a la desencadenada por el receptor P2Y1. Para determinar el ambiente en el que el ON se decanta por esta ruta de señalización, debemos analizar los distintos efectos que desencadena la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP.

En este trabajo, hemos demostrado que la activación de los receptores P2X3 provoca un aumento de la liberación de glicina en cultivos primarios (figura 15B), por lo que decidimos estudiar los efectos del ON en presencia de glicina. Para ello utilizamos un donador de ON, el nitroprusiato sódico (SNP), en una situación control (PBS1Xc) y en presencia de glicina. Analizamos la actividad del transportador (figura 26A) y la cantidad del mismo en membrana en estas dos situaciones (figura 26B). Además, se realizaron experimentos de transporte en cultivos tratados con Cys-NO, un agente que provoca S-nitrosilación (Ryuman, Watanabe et al. 2011).

En ensayos de transporte (figura 26A) el tratamiento con SNP inhibe un  $10,14 \pm 2,80\%$  al transportador mediante la vía del ON-GMPc (Jimenez, Zafra et al. 2011). El tratamiento con Cys-NO no tiene efectos sobre el transportador cuando se aplica solo pero si lo aplicamos junto con glicina, la actividad de GlyT2 aumenta un  $30,40 \pm 2,89\%$ . Del mismo modo ocurre con el SNP que pasa de inhibir a activarla a GlyT2 un  $16,35 \pm 3,53\%$ .

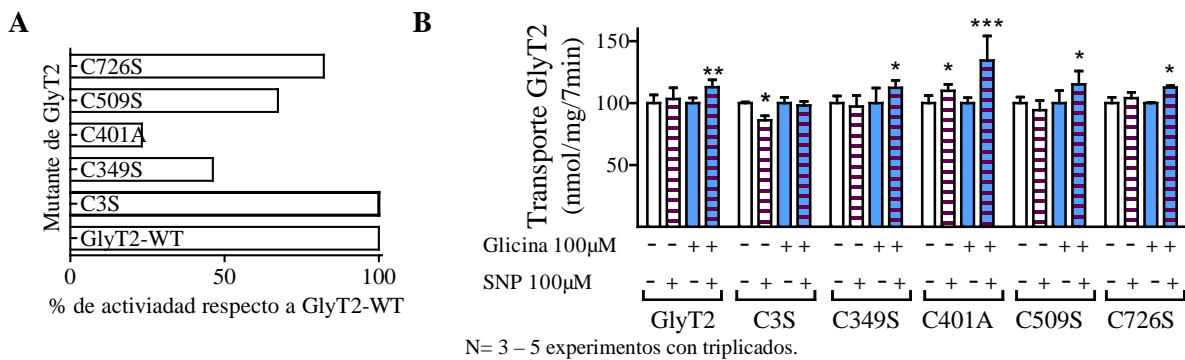


**Figura 26. Efecto de nitroprusiato en ausencia y en presencia de glicina extracelular sobre el transporte y la presencia en membrana de GlyT2.** Los cultivos neuronales se incubaron durante 5 min con PBSc o con PBSc + glicina 100µM. Sobre este medio, se añadió SNP o vehículo (PBS) hasta una concentración final de 100µM, y en el caso A también Cys-NO (400µM). **(A)** Se midió la actividad del transportador durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*\*, \*\*\* Diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , mediante ANOVA de dos factores, test de Bonferroni. N = 3 experimentos con triplicados. **(B)** Tras el tratamiento, se marcaron las proteínas de superficie con el reactivo de sulfo-NHS-biotina. Las proteínas marcadas se aislaron con estreptavidina inmovilizada y las muestras se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GlyT2 y anti-β-III-tubulina. El histograma representa la media ± SEM de la relación detectada de GlyT2 en la fracción correspondiente a la proteína de superficie biotinilada (B) comparada con la fracción de proteína total (T). En la imagen de inmunodetección, también se muestra la fracción de proteína no biotinilada (nB). Los datos se analizaron por densitometría mediante Image Lab Software 5.5 – BioRad. N = 2 experimentos con duplicados. Todo el experimento se realizó a 37°C y en oscuridad.

Mediante experimentos de biotinilación (figura 26B), hemos analizado como afecta el ON a la cantidad de transportador en membrana. De nuevo el nitroprusiato provoca una disminución de GlyT2  $13,67 \pm 5,25\%$ , mientras que la aplicación de SNP combinado con glicina, aumenta la cantidad de transportador en membrana un  $30,31 \pm 23,76\%$  reproduciendo los efectos de  $\beta\gamma$ -meATP. Estos resultados sugieren que es necesaria la conformación de GlyT2 unida al sustrato para que el ON pueda S-nitrosilar alguna de sus 22 cisteínas y activar el transporte.

El siguiente paso, fue realizar experimentos de transporte en células COS7 transfectadas con distintos mutantes de cisteínas de GlyT2 (figura 26) con el fin de averiguar cuál de las cisteínas es necesaria para la activación que desencadena el ON. Para la predicción de residuos susceptibles de nitrosilación se utilizó el software GPS-SON. Prediction of S-nitrosylation (<http://sno.biocuckoo.org/>). La actividad del transportador varía mucho de un tipo de mutante a otro por lo que los datos se expresan en porcentaje con respecto al genotipo silvestre GlyT2 (WT: *wild type*) (figura 27A). En células COS7 la aplicación de SNP durante 1 minuto en

oscuridad, no inhibe al transportador; y la aplicación de SNP en presencia de glicina, hace que GlyT2 aumente su transporte de manera significativa ( $12,81 \pm 5,12\%$ ); lo mismo ocurre con los mutantes de cisteínas en el bucle extracelular C349S y en segmentos transmembrana (C401A; C509S; y C726S) del transportador. Solo la mutación de la cisteína del extremo N-terminal (C3S), impide de manera reproducible este efecto. Ya que el óxido nítrico es una molécula difusible, lo más probable es que esta cisteína, en ausencia de sustrato presente alguna modificación o interacción que impida su S-nitrosilación.



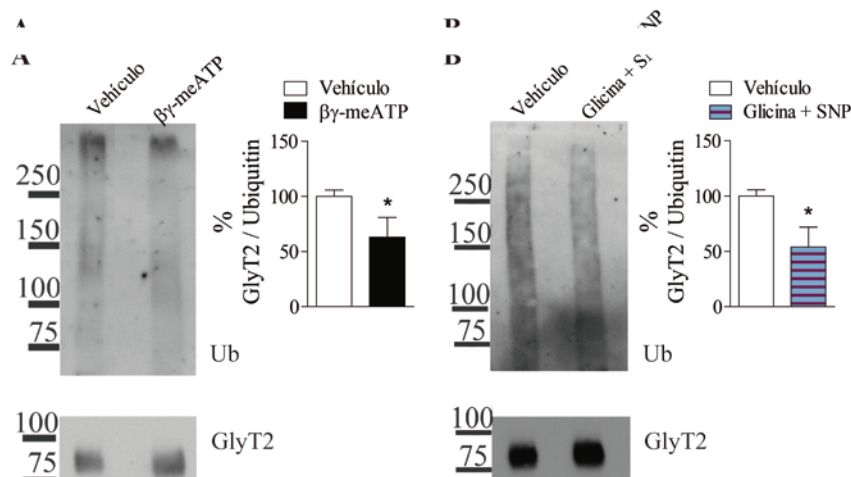
**Figura 27. Transporte de glicina en células COS7 transfectadas con GlyT2 y con mutantes de cisteínas de GlyT2.** Las células COS7 se transfectaron con distintas construcciones de GlyT2, y se sembraron en placas multi-pocillo. **(A)** Porcentaje de actividad de cada mutante con respecto a GlyT2-WT (genotipo silvestre). **(B)** Cada uno de los distintos mutantes se trató durante 5 min con PBS (blanco) o con PBS 100µM glicina (azul) y sobre este medio, se añadió vehículo (columnas lisas) o SNP (columnas rayadas) hasta una concentración final de 100µM durante 1 minuto. Por último se midió la actividad del transportador durante los 7 min posteriores al tratamiento. Los resultados de cada mutante, se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test de Bonferroni: \*, \*\*, \*\*\* diferencia con respecto al vehículo,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ .

Bonferroni posttests – de figura 26B							
Glicina 100M vs Glicina + SNP							
Row Factor	Glicina 100uM	Glicina + SNP	Difference	95% CI of diff.	t	P value	Summary
GlyT2	100,0	112,8	12,81	0.9821 to 24.65	2,915	P < 0.05	*
C3S	100,0	98,11	-1,890	-16.38 to 12.60	0,3510	P > 0.05	ns
C349S	100,0	112,2	12,25	2.003 to 22.50	3,218	P < 0.05	*
C401A	100,0	134,3	34,29	24.05 to 44.54	9,009	P < 0.001	***
C509S	100,0	115,1	15,06	2.511 to 27.61	3,230	P < 0.05	*
C726S	100,0	112,5	12,49	0.6555 to 24.32	2,841	P < 0.05	*

**Tabla 2. Resultados estadísticos de Figura 26B.** Análisis de los valores de transporte de células COS7 transfectadas con distintos mutantes en cisteínas de GlyT2. Los valores de transporte se analizaron en porcentaje. Se compara la actividad del mutante de GlyT2 o de GlyT2 silvestre en presencia de glicina y en presencia de glicina combinada con SNP

Las modificaciones por S-nitrosilación y nitración en las proteínas, pueden modificar funciones tan importantes como el plegamiento de proteínas, la ubiquitinación, la transmisión sináptica, y otras vías de transducción de señales. Se ha descrito que algunos transportadores de neurotransmisores sufren nitrosilaciones en que inhiben su actividad (Park, Ferrer et al. 2002, Bryan-Lluka, Papacostas et al. 2004, Cuddy, Gordon et al. 2012) y en otras proteínas la nitrosilación implica su desplazamiento a balsas lipídicas y el aumento de la actividad del mismo (Leon-Bollotte, Subramaniam et al. 2011).

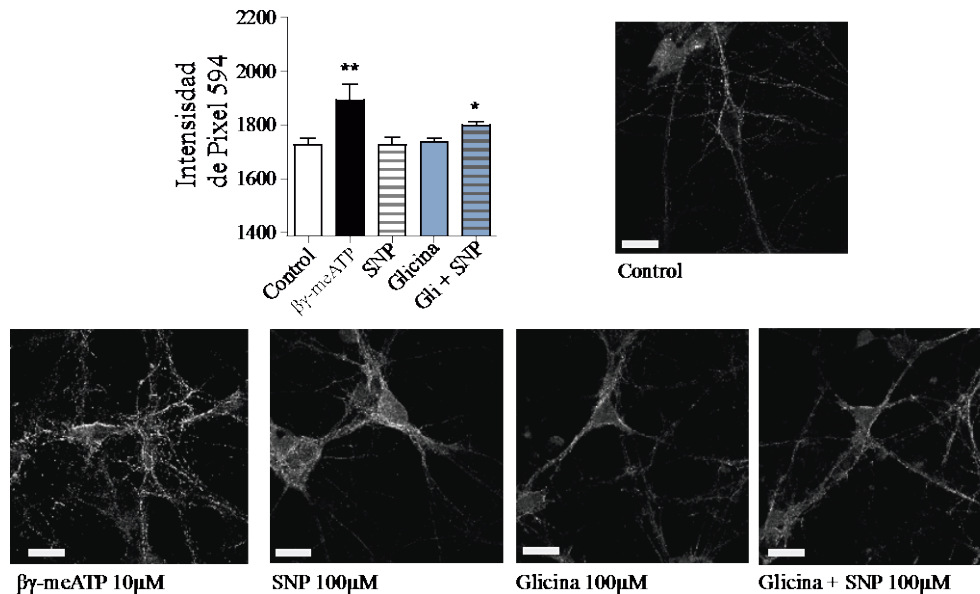
La presencia de glicina extracelular, permite que el ON modifique la actividad del transportador, que se acumula en membrana y aumenta su actividad al igual que sucede tras el tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP. Trabajos previos del laboratorio han descrito que la endocitosis de GlyT2 esta mediada por la ubiquitinación de residuos de lisina en su extremo C terminal (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013a). Por ello, se analizó el estado de ubiquitinación de la proteína en cultivos primarios de tallo cerebral tratados con  $\beta\gamma$ -meATP, así como con SNP + glicina.



**Figura 28. Efecto de los tratamientos con  $\beta\gamma$ -meATP y glicina + SNP sobre el estado de ubiquitinación de GlyT2.** Los cultivos primarios se sembraron en placas P60 recubiertas con PDL y se dejaron crecer durante 16 días. Las células se trataron con vehículo (PBS(A)/glicina(B)), (A)  $\beta\gamma$ -meATP (5 min), o (B) con una combinación de glicina 100 $\mu$ M (5 min) + SNP 100 $\mu$ M (1 min) en oscuridad y a 37°C. Inmediatamente después, se levantaron las células, se lisaron y se inmunoprecipitaron cantidades idénticas de cada muestra con anti-GlyT2. La fracción inmunoprecipitada de GlyT2 se analizó por inmunodetección con anti-ubiquitina (Ub) y con anti-GlyT2 (GlyT2). Resultados representativos de cuatro experimentos independientes. Diferencia significativo  $p < 0,05$  mediante prueba de *t*-Student.

En los cultivos incubados con  $\beta\gamma$ -meATP durante 5 minutos, se detectó un  $34,00 \pm 10,05\%$  menos de transportador ubiquitinado. El tratamiento de SNP durante 1 minuto en presencia de glicina, también hace disminuir la ubiquitinación del transportador, en este caso un  $43,03 \pm$

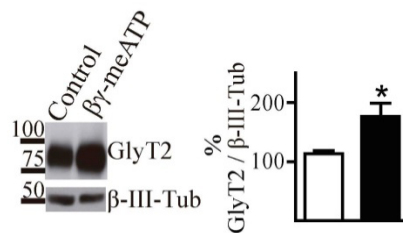
10,55%. Una menor ubiquitinación, correspondería a una menor endocitosis, lo que se correlaciona con la mayor cantidad de transportador que hay en membrana tanto en el caso del tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP (figura 1E, 32), como en el caso del tratamiento combinado de glicina + SNP (figura 26, 32). Quisimos confirmar mediante otra técnica adicional el aumento de GlyT2 en membrana en cultivos neuronales tras la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP y de SNP en presencia y ausencia de glicina. Para ello se realizó inmunofluorescencia en cultivos primarios (figura 29).



**Figura 29. Inmunocitoquímica en cultivos neuronales.** Las neuronas se sembraron sobre cubres recubiertos con PDL y se dejaron en cultivo durante 16 días. Se separaron en grupos de 3 cubres para los diferentes tratamientos: control sin tratamiento,  $\beta\gamma$ -meATP (5 min), SNP (1 min), glicina 100 $\mu$ M (5 min) y glicina 100 $\mu$ M (5 min) con SNP 100 $\mu$ M (1 min). Todos los tratamientos se realizaron a 37°C y en oscuridad. Inmediatamente después las células se fijaron con PFA 4% y se realizó la inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GlyT2. Se realizaron 10 fotos de campos representativos de cada cubre con un microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss). Para la cuantificación de GlyT2 en membrana, se analizaron las imágenes del canal 594 que se representa en blanco en 16bit 1024x1024 con el programa *Image J*. Se delimitó manualmente el área de membrana y se cuantificaron los pixeles con valores umbrales de escala de grises entre el 1386 y 4095. La barra de escala corresponde a 20 $\mu$ M. En el histograma se representa el valor promedio de pixeles  $\pm$  SEM. \*, \*\* Diferencia con respecto al control  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$ , mediante ANOVA de un factor, test de Tukey.

Los experimentos de inmunocitoquímica revelaron ligeros incrementos en la cantidad de GlyT2 en membrana en los tratamientos con glicina + SNP ( $6,57 \pm 1,39\%$ ), y  $\beta\gamma$ -meATP ( $9,57 \pm 2,81\%$ ) que sí resultaron ser significativos.

El ON, es una molécula que se ha relacionado en multitud de trabajos con la activación de los receptores purinérgicos (Fukuhara, Imai et al. 2000, Martucci, Trovato et al. 2008) y con la percepción del dolor (Miclescu and Gordh 2009). Nuestros resultados indican que el ON está implicado en la señalización de P2X3 sobre GlyT2 favoreciendo su nitrosilación y aumentando su presencia en membrana. Adicionalmente, con los resultados de los distintos experimentos, confirmamos que la estimulación con  $\beta\gamma$ -meATP produce además una sobreexpresión de GlyT2 (figura 30).



N = 10 experimentos.

**Figura 30. Inmunodetección de GlyT2 en cultivos primarios.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados 5 min con vehículo (PBS) o con  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M. Inmediatamente después, se levantaron las células, se lisaron y se analizaron cantidades idénticas de proteína mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GlyT2 y anti- $\beta$ -III-tubulina. El histograma representa la media  $\pm$  SEM de la relación detectada entre GlyT2 /  $\beta$ -III-tubulina. \*, Diferencia con respecto a vehículo  $p < 0,05$ , mediante prueba de *t*-Student.

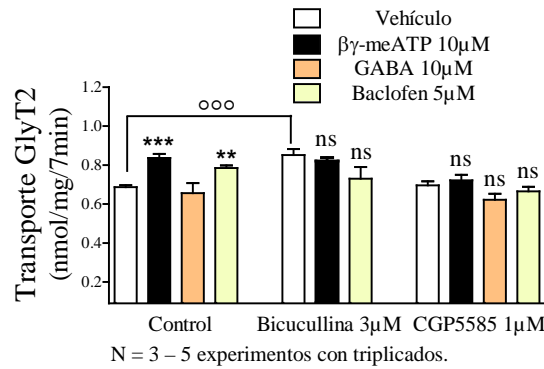
## **7. ESTUDIO DE POSIBLES RUTAS QUE INTERACCIONAN:**

Para averiguar si el aumento de la actividad de GlyT2 es un mecanismo común en la señalización del dolor, hemos analizado la actividad del transportador al activar o inhibir vías conocidas por participar positiva o negativamente en la transmisión del dolor.

### **7.1.- RECEPTORES DE GABA.**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es junto a la glicina el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Existen dos clases bien diferenciadas de receptores de GABA: los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> que son canales de cloruro localizados en el terminal postsináptico y que al abrirse hiperpolarizan la neurona, y los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>, localizados tanto en el terminal postsináptico como en la presinapsis asociados a proteínas Gai/o. Tanto la inhibición de los receptores de GABA<sub>A</sub> como de los receptores de glicina en médula espinal, está asociada a un aumento de la sensibilización dolorosa (Sivilotti and Woolf 1994). La participación de los receptores GABA<sub>B</sub> en la señalización nociceptiva, está condicionada por su localización y por factores del entorno (McCarson, Ralya et al. 2005, Kasten and Boehm 2015).





**Figura 31. Efecto de antagonistas y agonistas de receptores de GABA sobre la actividad del transportador GlyT2, y reversión del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 5 min a 37°C con vehículo (PBS),  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M, GABA 10 $\mu$ M o con baclofen 5 $\mu$ M, en ausencia (control) o presencia de distintos antagonistas de receptores de GABA añadidos 5 min antes del agonista: bicuculina 3 $\mu$ M como antagonista de GABA<sub>A</sub>, y CGP5585 1 $\mu$ M como antagonista de GABA<sub>B</sub>. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor, test de Tukey con respecto a su antagonista en cada caso: \*\*, \*\*\* diferencia con  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0001$ . Los efectos de cada uno de los antagonistas se analizaron mediante el test de Tukey con respecto al control sin antagonista y con vehículo: °°° diferencia con  $p < 0,0005$ .

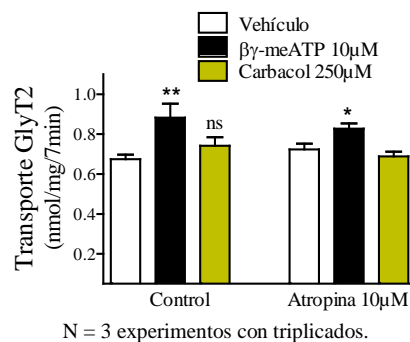
La aplicación del neurotransmisor inhibitorio GABA, no tiene efectos significativos sobre GlyT2. Sin embargo, el uso de baclofen, que activa a los receptores GABA<sub>B</sub>, provoca un aumento del transporte del  $15,15 \pm 3,46\%$ .

Cuando bloqueamos los receptores de GABA<sub>A</sub> con bicuculina, también registramos un aumento de la actividad del transportador ( $23,89 \pm 3,78\%$ ) que es similar al efecto  $\beta\gamma$ -meATP ( $20,49 \pm 4,61\%$ ). Curiosamente, la inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub> es un mecanismo asociados al dolor (Sivilotti and Woolf 1994) e induce la activación de GlyT2. Los efectos de bicuculina y  $\beta\gamma$ -meATP, no se suman, seguramente debido a que la bicuculina inhibe los canales SK<sub>Ca</sub>, (Khawaled, Bruening-Wright et al. 1999) cuya actividad es necesaria para la regulación de P2X3 sobre GlyT2 (figura 20: apamina).

Además, vemos que el CGP5585 1 $\mu$ M, un inhibidor de los receptores GABA<sub>B</sub>, y que por lo tanto impide totalmente el efecto de baclofen, revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, que aunque mantiene la tendencia, no es significativa ( $3,61 \pm 7,25\%$ ). La inhibición de GABA<sub>B</sub> bloquea la liberación de NT en la sinapsis (Yang, Ma et al. 2015), debido a que es necesaria una liberación de vesículas para la llegada del transportador a membrana, es razonable que CGP5585 impida el aumento de la actividad de GlyT2.

## 7.2.- RECEPTORES MUSCARÍNICOS (mACh).

Los receptores muscarínicos son un tipo de receptores colinérgicos que se distribuyen por todo el SNC (Hoglund and Baghdoyan 1997). Se han clonado cinco subtipos: M1 - M5. En las astas dorsales de la médula espinal encontramos los tipos M2, M3 y M4, que se han descrito en neuronas inhibitoras glicinérgicas junto a los receptores GABA<sub>B</sub> con importantes efectos sobre la actividad glicinérgica, gabaérgica (Zhang, Li et al. 2005) y glutamatérgica (Chen, Chen et al. 2010). M2 y M4 están acoplados a proteínas G $\alpha$ i/o (Felder 1995). Su activación se asocia a una inhibición de la liberación de glicina (Zhang, Zhou et al. 2007) y a un efecto analgésico (Ma, Dohi et al. 2001, Duttaroy, Gomeza et al. 2002). El receptor M3 está asociado a proteínas G $\alpha$ q y su actividad potencia las corrientes glicinérgicas inhibitoras en las astas dorsales de médula espinal de rata (Wang, Zhang et al. 2006).



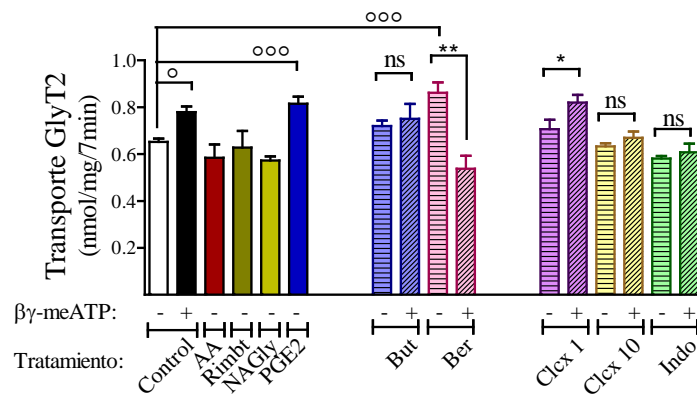
**Figura 32. Efecto de receptores muscarínicos de acetilcolina sobre la actividad de GlyT2 y la acción de  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 5 min a 37°C con vehículo (PBS),  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M, o carbacol 250 $\mu$ M, en ausencia (control) o presencia del antagonista de receptores de muscarínicos: atropina 10 $\mu$ M que se añadió 5 min antes de los agonistas. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. \*, \*\* Diferencia con respecto al vehículo  $p < 0,05$ ,  $p < 0,1$ , mediante ANOVA dos factores, test de Bonferroni. N = 3 experimentos, 3 réplicas por experimento.

En la gráfica 35, de nuevo el  $\beta\gamma$ -meATP aumenta el transporte de GlyT2 un  $32,15 \pm 11,37\%$ . El carbacol, un agonista general de los receptores muscarínicos, no tiene efectos significativos sobre la actividad del transportador. Además, el uso de un antagonista general de estos receptores no impide el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP que provoca un aumento del  $14,38 \pm 5,39\%$  del transporte de GlyT2 en presencia de atropina. Está descrito que los receptores muscarínicos modulan la neurotransmisión glicinérgica inhibitora (Wang, Zhang et al. 2006, Zhang, Zhou et al. 2007), pero los resultados de esta gráfica muestran que no interfieren con la actividad del transportador y por lo tanto que el mecanismo mediante el cual los receptores muscarínicos modulan esta neurotransmisión es diferente al de los receptores purinérgicos.



### 7.3.- PROSTANOIDES Y OTROS MEDIADORES INFLAMATORIOS.

Los prostanoideos, son derivados del ácido araquidónico (AA). El AA se sintetiza a partir de fosfolípidos de membrana por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2). Una vez sintetizado el AA es metabolizado por la ciclooxigenasa (COX) que pueden originar formación de endocannabinoides y de prostanoideos (Milatovic, Montine et al. 2011). Los receptores de endocannabinoides tienen importantes propiedades analgésicas, el principal receptor de este grupo que se expresa en el SNC es el denominado CB1 (Farquhar-Smith, Egertova et al. 2000). En cuanto a los prostanoideos, el más estudiado es la prostaglandina E2 (PGE2) por su implicación en dolor inflamatorio e hiperalgesia (Sugita, Kuwabara et al. 2016). En la figura 33, se representan los efectos del AA, de algunos agonistas cannabinoides (rimonabant y *N*-araquidonilglicina) y del prostanoide PGE2 sobre la actividad del transportador.



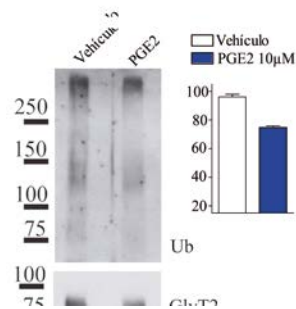
**Figura 33. Regulación de GlyT2 por prostaglandina 2 y reversión del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 5 min a 37°C con vehículo (PBS) o  $\beta\gamma$ -meATP 10 $\mu$ M, en ausencia (control) o presencia de distintos moduladores de inflamación: butaprost 10 $\mu$ M (But), beraprost 10  $\mu$ M (Ber), celecoxib 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M (Celc) e indometacina 0,1 $\mu$ M (Indo). Todos los tratamientos se añadieron al cultivo durante 10 min previos al vehículo/agonista. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento con vehículo/agonista. Se estudió la reversión del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP mediante prueba de *t*-Student: \*, \*\* diferencia significativa  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$ , respectivamente. En paralelo, distintas réplicas del cultivo se trataron durante 5 minutos con ácido araquidónico 10 $\mu$ M (AA), rimonabant 1 $\mu$ M (Rimbt), *N*-araquidonilglicina (NAGly) 0,1 $\mu$ M o durante 90 min con PGE2 10 $\mu$ M. Se realizó un tratamiento de 5 y 90 min respectivamente con el vehículo (etanol 1:10000). Estos vehículos no mostraron diferencias con respecto al control con PBS. Se analizaron mediante ANOVA de un factor, y test de Tukey, las diferencias entre el control no tratado y cada uno de los agonistas de receptores utilizados. °, °°, Diferencia con respecto al control,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ .

El AA a la concentración de 10 $\mu$ M no tiene efectos significativos sobre GlyT2, de igual manera, los cannabinoides (rimonabant 1 $\mu$ M y *N*-araquidonilglicina 0,1 $\mu$ M) tampoco tienen efectos significativos sobre el transportador. Sin embargo, vemos que el tratamiento con el prostanoides proinflamatorio PGE2 implica un aumento de la actividad de GlyT2 (24,98  $\pm$  4,67%) similar al que provoca la estimulación con  $\beta\gamma$ -meATP (19,51  $\pm$  4,14%). De nuevo, un reactivo asociado con la señalización nociceptiva, induce un incremento del transporte de glicina de GlyT2.

La PGE2 al unirse a su receptor EP2, inhibe los receptores de glicina postsinápticos, pero el uso de butaprost, un agonista de EP2, no reproduce el efecto de PGE2, por lo descartamos una regulación retrograda del receptor GlyR sobre el transportador GlyT2. El uso de beraprost, un agonista de receptores de prostaglandina EP3, conlleva un aumento de la actividad de GlyT2 del 38,18  $\pm$  5,52%. El receptor EP3 es abundante en los terminales sinápticos. Curiosamente, la combinación de beraprost y de  $\beta\gamma$ -meATP, inhibe la acción de ambos. Este tipo de retroinhibición se ha descrito ya en varios sistemas como es el caso de la activación simultánea de los receptores P2X2 y GABA<sub>A</sub>, que inhibe la respuesta de P2X2 (Sokolova, Nistri et al. 2001) o de la activación simultánea de P2X3 y receptores nicotínicos que también anula la respuesta de P2X3 (Nakazawa 1994, Barajas-Lopez, Espinosa-Luna et al. 1998, Zhou and Galligan 1998).

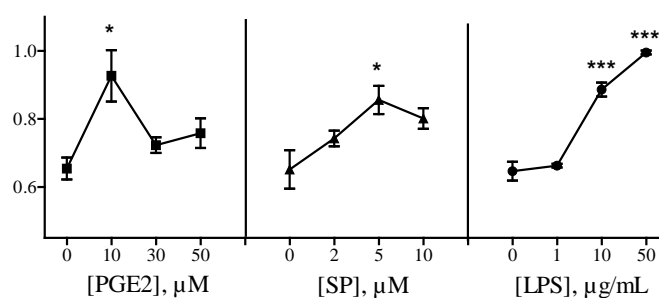
Por otro lado, la inhibición de la isoforma ubicua de ciclooxigenasa: COX1 con el antagonista indometacina o con celecoxib 10 $\mu$ M, revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, esto no es de extrañar, ya que los antagonistas de COX1 inhiben la expresión en membrana de P2X3 (Wang, Zhang et al. 2010). Además el inhibidor de COX2 con celecoxib 1 $\mu$ M minimiza la activación del transportador aunque sigue siendo significativa (16,12  $\pm$  4,24%) lo que significa que este proceso no desencadena la liberación de prostanoides.

En nuestro laboratorio, la acción de PGE2 sobre GlyT2 ya había sido estudiada por el doctor Jaime de Juan-Sanz, que además identificó el receptor de PGE2 implicado en la regulación (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013c). En esta tesis, se ha confirmado que los efectos de PGE2 sobre el transporte, expresión en superficie y ubiquitinación del transportador son análogos a los producidos por  $\beta\gamma$ -meATP (figura 34), lo que sugiere que ambos tratamientos conducen a una mayor actividad de GlyT2, un aumento de transportador en membrana y una menor ubiquitinación mediante distintos mecanismos de señalización.



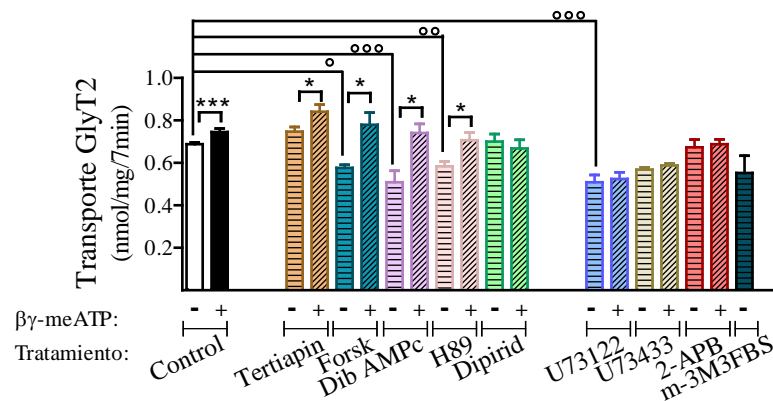
**Figura 34. Ubiquitinación de GlyT2 tras tratamiento con PGE2.** Los cultivos primarios se sembraron en placas P60 recubiertas con PLL y se dejaron crecer durante 16 días. Las células se trataron con PGE2 o vehículo (etanol 1:10000) durante 90 minutos. Inmediatamente después, se levantaron las células, se lisaron y se inmunoprecipitaron cantidades idénticas de cada muestra con anti-GlyT2. La fracción inmunoprecipitada de GlyT2 se analizó por inmunodetección con anticuerpo anti-ubiquitina, y se normalizó con la cantidad de GlyT2 detectada en esta fracción.

Puesto que los resultados presentados sugieren que distintas señales de dolor ejercen una regulación positiva de la actividad de GlyT2, realizamos experimentos con distintos mediadores de dolor para averiguar si la activación del transportador es un efecto común en la señalización nociceptiva. Los tiempos y concentraciones de cada tratamiento se determinaron en base a trabajos descritos en los que se prueban los efectos nociceptivos de estos reactivos (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013c); (Park, Bae et al. 2010, Rojewska, Piotrowska et al. 2016). En la figura 35, se representan estos resultados que confirman que el aumento de la actividad de GlyT2 es un factor común en distintos tratamientos pronociceptivos.



**Figura 35. Transporte de GlyT2 en cultivos primarios en presencia de agentes pronociceptivos.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados con dosis crecientes de distintos mediadores pronociceptivos según se indica en la gráfica: PGE<sub>2</sub> 0, 10, 30 Y 50 µM – 90 min. SP 0, 2, 5, 10 – 5 min. LPS 0, 1, 10 y 50µg/mL – 20 horas. Se midió la actividad del transportador durante los 7 min posteriores al tratamiento. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. \*, \*\*\* Diferencia con respecto a la concentración 0 de cada caso, p<0,05, p<0,0001, mediante ANOVA de un factor, test de Tukey.

Varios de los antagonistas que aumentan la actividad de GlyT2 en el sistema experimental utilizado, han sido descritos como pronociceptivos y otros mediadores inflamatorios que inducen dolor también activan a GlyT2. Los receptores inhibidos o estimulados en estos casos son receptores asociados a proteínas G (GPCR): GABA<sub>B</sub>, EP3, mGlu3 todos ellos están acoplados a proteínas G<sub>ai</sub> y están presentes en la postsinapsis de interneuronas glicinérgica (Zeilhofer, Wildner et al. 2012) y el receptor neurokinina 1 (NK1) presente en fibras C peptidérgicas de la lámina I de las astas dorsales de la médula espinal que se activa por SP y se asocia a proteína G<sub>αQ</sub>. En base a esta premisa del comportamiento de GlyT2 en nocicepción, y con el fin de aportar información adicional sobre posibles rutas implicadas en dolor, se muestran los resultado de transporte de actividad de GlyT2 activando las distintas rutas desencadenadas por las proteínas G.



**Figura 36. Regulación de GlyT2 por vías de señalización que implican proteínas G y reversión del efecto de βγ-meATP.** Los cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal fueron tratados durante 5 min a 37°C con vehículo (PBS) o βγ-meATP 10μM, en ausencia (control) o presencia de distintos moduladores de la señalización mediada por GPCR a través de proteínas G: tertiapin 0,3μM, forskolina 10μM, dibutril-AMPC 2mM, H89 10μM, dipiridamole 25μM, U73122 10μM, U73433 10μM, 2-APB 100μM, m-3M3FBS 25μM. La actividad del transportador se midió durante los 7 min posteriores al tratamiento. Se estudió la reversión del efecto de βγ-meATP mediante prueba de *t*-Student: \*, \*\*\* diferencia significativa p<0,05. Asimismo, se analizaron mediante ANOVA de un factor y test de Tukey las diferencias entre el control no tratado y cada uno de los inhibidores/activadores de la vía de proteínas G sin agonista. °, °°, °°°, Diferencia con respecto al control con vehículo, p<0,05, p<0,005, p<0,0001.

En la cascada de señalización desencadenada por proteínas G tenemos que el tratamiento con forskolina, un activador de adenilato ciclasa (AC), inhibe a GlyT2 un 16,67%, pero no revierte el efecto de βγ-meATP que activa al transportador un 21,82 ± 9,34% cuando se aplica en presencia de forskolina. El dibutril-AMPC, también inhibe a GlyT2 26,78%, pero no revierte el

efecto de  $\beta\gamma$ -meATP ( $20,53 \pm 9,19\%$ ). La inhibición de los canales de potasio de rectificación interna ( $K_{IR}$ ) con tertiapin  $0,3\mu\text{M}$ , aumenta la actividad de GlyT2 aunque no es significativo, y no revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP ( $14,02 \pm 5,65\%$ ). La inhibición de PKA con H89, disminuye un  $14,49\%$  la actividad de GlyT2, pero tampoco revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP ( $13,56 \pm 6,54\%$ ). Si se bloquea la hidrolisis de GMPc con dipiridamole, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), no hay efectos sobre la actividad de GlyT2 y se pierde el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.

La inhibición de PLC con U73122, inhibe a GlyT2 un  $23,63\%$  y revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. El U73433 es un compuesto de estructura muy similar al U73122, pero este no inhibe a la enzima fosfolipasa C, ambos reactivos se utiliza en paralelo como control de inespecificidad. El U73433 también impide la activación del transportador por el agonista de P2X3, indicando que el efecto no es específico de fosfolipasa C. La activación de PLA2 no reproduce el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. La inhibición de IP3R con 2-APB no tiene efectos sobre GlyT2, pero si revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, la inhibición de IP3R puede inhibir a PKC, esta kinasa es necesaria para que  $\beta\gamma$ -meATP active a GlyT2 (figura 16).



## **DISCUSIÓN.**





## **1. PAPEL DE GLYT2 EN SEÑALIZACIÓN DEL DOLOR**

La función de las interneuronas inhibitoras en la médula espinal va más allá del control motor y el procesamiento de la información somatosensorial, está implicada en la generación, mantenimiento y cronificación de distintos estados de dolor (Vandenberg, Ryan et al. 2014). Esta neurotransmisión está mediada por las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas que se activan como respuesta a la estimulación de las fibras sensoriales (A $\beta$ , A $\delta$ , y C) (Foster, Wildner et al. 2015). Estudios de varios grupos han analizado la respuesta de las neuronas postsinápticas al estimular un tipo u otro de interneurona, pues se propone que la especialización sináptica está determinada por los receptores que se activan en la postsinapsis que determina la respuesta. Sin embargo, la actividad de los transportadores de glicina, localizados en la presinapsis y en la glía adyacente, regulan la concentración y el tiempo de actuación del neurotransmisor en la hendidura sináptica, y por ello, desde hace tiempo, se estudia el mecanismo de regulación de los GlyTs por su importancia en la señalización del dolor y su participación en el desarrollo de enfermedades del SN (Carland, Handford et al. 2014).

En nuestro laboratorio, un trabajo anterior demostró que los P2YR son capaces de regular la actividad de los transportadores de glicina en cultivos primarios de neuronas de médula espinal (Jimenez, Zafra et al. 2011). Así, la activación farmacológica de P2Y1 disminuía el transporte de glicina de GlyT2 y aumentaba el de GlyT1. Debido a que este receptor purinérgico inhibe los canales de calcio tipo N, a esta regulación negativa de GlyT2 se le atribuyen propiedades analgésicas (Gerevich and Illes 2004). Existe una complementariedad en la actuación de los receptores P2Y1 y P2X3 (Boue-Grabot, Toulme et al. 2004) dado que P2Y1 parece promover una función inhibitora y P2X3 excitadora, modulando la liberación de neurotransmisor glutamato en áreas cerebrales, en médula espinal y en DRGs (Gerevich, Muller et al. 2005, Rodrigues, Almeida et al. 2005, Heinrich, Kittel et al. 2008). Son muchos los trabajos que relacionan a P2X3R con la percepción del dolor y el establecimiento del dolor neuropático. En esta investigación pretendemos averiguar si P2X3R regula la neurotransmisión glicinérgica en la médula espinal, y quisimos estudiar la implicación del transportador GlyT2 en vías nociceptivas. Para ello, se ha utilizado fundamentalmente el agonista de receptores que incluyen la subunidad P2X3,  $\beta\gamma$ -meATP. El tratamiento con este compuesto en cultivos primarios de médula espinal y tallo cerebral de rata donde los receptores P2X son abundantes, estimula la actividad del transportador GlyT2 aumentando sus parámetros cinéticos y su expresión en superficie. La activación es rápida pero requiere al menos 5 min para ser detectada,

pues es sutil pero consistente, y se mantiene en el tiempo al menos 90 min. El tiempo y la concentración de agonista que produce un efecto máximo concuerdan con las características de los receptores P2X que incluyen la subunidad P2X3. Es de destacar que la acción de P2X3R sobre GlyT2 no es dependiente de la dosis, esto es debido a las características farmacológicas de este receptor, cuyo intervalo de concentración funcional es muy estrecho. Concentraciones de agonista por debajo de un óptimo no estimulan el receptor deseado y por encima, lo desensibilizan (Rettinger and Schmalzing 2003, Pratt, Brink et al. 2005).

Con objeto de conocer si la señalización nociceptiva puede modular a GlyT2, además del estudio con herramientas farmacológicas selectivas de P2X3R, se han utilizado otros compuestos en las condiciones de tiempo y concentración que facilitan la señal dolorosa: PGE2 (Eijkelkamp, Wang et al. 2010), SP (Park, Bae et al. 2010) y LPS (Rojewska, Piotrowska et al. 2016). Estas sustancias pronociceptivas estimulan también el transporte de GlyT2, lo que sugiere que la activación del transportador es un mecanismo común en dolor. Otra situación asociada a la sensación de dolor es la inhibición de receptores de GABA<sub>A</sub> (Sivilotti and Woolf 1994), que en este trabajo demostramos que también es capaz de activar a GlyT2. El perfil del efecto de cada tratamiento sobre la actividad del transportador es diferente. Así, la PGE2 presenta un efecto bifásico sobre la actividad de GlyT2 que podría estar relacionado con el papel dual pro y anti-inflamatorio de este prostanoides, una de las principales moléculas de la señalización inflamatoria (Legler, Bruckner et al. 2010, Shi, Johansson et al. 2010). A pesar de que PGE2 y  $\beta\gamma$ -meATP producen una activación del transportador con aumento de la cantidad de este en membrana y reducida ubiquitinación (de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013c), la vía de señalización de ambos compuestos no puede ser la misma. La PGE2 se sintetiza a partir del AA mediante la actividad de la enzima COX2, y la inhibición de COX2 no revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. Por otro lado, la SP, que actúa sobre su receptor NK1 especialmente abundante en la lámina I de *Rexed*, y cuya activación desencadena un aumento de la actividad de NMDAR y la síntesis de prostanooides y ON (Noguchi, Kawai et al. 1995, Cizkova, Lukacova et al. 2002), activa al transportador en pocos minutos de manera bifásica de forma similar a la PGE2. Por último, el LPS actúa sobre el receptor TLR (*Toll-like receptor*) que activa al factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B induciendo la producción de citocinas inflamatorias y aumentando la transcripción de genes pro-inflamatorios: el tratamiento con LPS provoca una activación exponencial del transportador dependiente de la dosis.

Los estudios de eliminación génica revelaron que el transportador neuronal GlyT2, es el responsable de proporcionar glicina en la interneurona para el rellenado de vesículas sinápticas,

por lo que se le atribuyó la función de mantener la actividad glicinérgica (Gomez, Ohno et al. 2003b, Rousseau, Aubrey et al. 2008). Sin embargo, estudios posteriores, demostraron que un bloqueo parcial a largo plazo de GlyT2 no elimina la neurotransmisión glicinérgica y que los terminales sinápticos mantienen la concentración de glicina durante largos periodos de tiempo independientemente de GlyT2. En algunos casos, este bloqueo crónico reduce la frecuencia de las mIPSC sin afectar a la amplitud, lo que sugiere que GlyT2 podría regular la exocitosis de glicina en la presinapsis (Apostolides and Trussell 2013). Además, en distintos modelos animales de dolor neuropático e inflamatorio, la aplicación prologada de inhibidores de GlyT1 y de GlyT2 induce analgesia debido a un aumento del tiempo de permanencia del NT inhibitor en la hendidura sináptica (Morita, Motoyama et al. 2008, Tanabe, Takasu et al. 2008, Dohi, Morita et al. 2009, Hermanns, Muth-Selbach et al. 2009, Haranishi, Hara et al. 2010, Nishikawa, Sasaki et al. 2010, Barthel, Urban et al. 2014, Carland, Handford et al. 2014). En este trabajo, proponemos que GlyT2 es responsable de regular la concentración de glicina en la sinapsis y su activación implica una disminución de la actividad glicinérgica inhibitora, lo que explica que compuestos nociceptivos lo activen (LPS, SP, PGE2 y agonistas P2X3R) y los compuestos analgésicos no (cannabinoides), además, esta descrito que algunos endocannabinoides como la NAGly a determinada dosis, se une al transportador y lo inhibe, lo que provoca analgesia en modelos de dolor (Succar, Mitchell et al. , Edington, McKinzie et al. 2009). Esta teoría ha sido ampliamente discutida por autores como Harvey y Vandenberg (Harvey and Yee 2013, Vandenberg, Ryan et al. 2014), que coinciden en atribuir a GlyT2 la capacidad de regular el tiempo de actuación y la cantidad de glicina en sinapsis. Adicionalmente, Zeilhofer demostró que el 70% de la actividad inhibitora en las astas dorsales de la médula espinal esta mediada por glicina y que la potenciación de la neurotransmisión glicinérgica induce analgesia (Foster, Wildner et al. 2015). Estos hallazgos han puesto en marcha un estudio que actualmente se encuentra en fase 2 con el uso de un nuevo fármaco para tratamiento del dolor neuropático: el VVZ-149 descrito como un inhibidor de GlyT2 que también inhibe a 5HT<sub>2A</sub> y a P2X3 (Pang, Kim et al. 2012).

## **2. RECEPTORES PURINÉRGICOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD DE GLYT2.**

Ya hemos mencionado las complicaciones ligadas al estudio de los receptores purinérgicos y su farmacología. Por ese motivo, hemos analizado en detalle el efecto de los fármacos seleccionados tanto en sistemas de expresión heteróloga como en el cultivo primario neuronal en

el que hemos trabajado. Así, hemos confirmado que el agonista  $\beta\gamma$ -meATP a la concentración de  $10\mu\text{M}$  activa a receptores compuestos por P2X3 y también activa a la subunidad P2X2. Esta conclusión fue posible gracias a los resultados de microfluorimetría de calcio en células 1321N1 transfectadas con las distintas subunidades y también, en cultivos primarios, donde la presencia de antagonistas de P2X3R, impidió que el  $\beta\gamma$ -meATP desencadenara respuesta de calcio (figura 4). La identificación del receptor P2X3 como el causante de la estimulación de GlyT2 se ha llevado a cabo mediante distintos abordajes experimentales. El enriquecimiento de los cultivos con DRGs que contienen P2X3Rs, magnificó el incremento del transporte y, la inhibición del receptor, tanto farmacológicamente como con shRNAi, revertió la activación del transportador. Además, la respuesta de GlyT2 a  $\beta\gamma$ -meATP en presencia de DHEA disminuye de manera dosis dependiente, lo que confirma que este agonista actúa a través del receptor P2X3 (Liu, Hsieh et al. 2001). El heterómero P2X2/3 también es capaz de activar el transporte de GlyT2 al ser estimulado con  $\alpha\beta$ -meATP. Este heterómero confiere al receptor una menor sensibilización y una recuperación más rápida que P2X3 (Burnstock 2007). En las condiciones de cultivo primario, el  $\alpha\beta$ -meATP ha demostrado ser más inestable, probablemente por la presencia de ectonucleotidasas que lo hidrolizan más rápidamente que a  $\beta\gamma$ -meATP (Joseph, Pifer et al. 2004). La hidrólisis de  $\alpha\beta$ -meATP da lugar a intermediarios que activan otros receptores, concretamente a P2Y1, de ahí, que sea necesario la potenciación de la interacción de  $\alpha\beta$ -meATP con su receptor mediante la aplicación de DHEA para lograr el aumento de transporte de GlyT2 (De Roo, Rodeau et al. 2003). La activación farmacológica únicamente de P2X2R con 2MeS-ATP no estimula el transportador, lo que demuestra que este receptor por si solo no regula a GlyT2. Esto explica que con la administración de la progesterona, que aumenta la afinidad de los agonistas por la subunidad P2X2 (De Roo, Boue-Grabot et al. 2010), no se observe ningún efecto de los fármacos sobre el transporte. Sin embargo, esta subunidad parece ser necesaria, ya que el uso del antagonista PPADS o, si impedimos su expresión mediante shRNAi, anulamos el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.

Otro conflicto farmacológico es el que implica al receptor P2X1. La concentración utilizada de  $\beta\gamma$ -meATP se encuentra dentro de la ventana de estimulación de P2X1 (Burnstock 2007). Sin embargo, hemos descartado esta interacción ya que la expresión del receptor en células 1321N1 demostró que P2X1 no responde a este agonista, aunque no podemos descartar que participe de forma indirecta, ya que es común que la actividad de los P2, provoque la activación o la inhibición otros receptores de la misma familia, incluso de otras distintas. Es el caso de la sinergia de P2X1 y P2Y1 en la regulación del equilibrio de la agregación plaquetaria

(Vial, Rolf et al. 2002b). O el de los P2X4R y P2X7R que se activan en situación de dolor inflamatorio e inducen la liberación de PGE2 o IL-1 $\beta$  respectivamente, estos mediadores a su vez potencian la actividad de P2X3R (Ferrari, Pizzirani et al. 2006, Wang, Li et al. 2007a, Ulmann, Hirbec et al. 2010, Noma, Shinoda et al. 2013). Sin embargo, esta regulación parece ser unidireccional, ya que los antagonistas de P2X4 y 7 no impiden ni potencian la respuesta de GlyT2 al tratamiento con  $\beta\gamma$ -meATP. También hay una interacción de retroinhibición anteriormente mencionada entre P2X3R y P2Y1R. P2Y1 es un receptor metabotrópico que al unirse a su agonista (ADP) inhibe a P2X3 e induce analgesia (Gerevich and Illes 2004, Chen, Li et al. 2015). Además, P2Y1 inhibe a GlyT2 mediante la activación de nNOS y la vía del GMPC (Jimenez, Zafra et al. 2011).

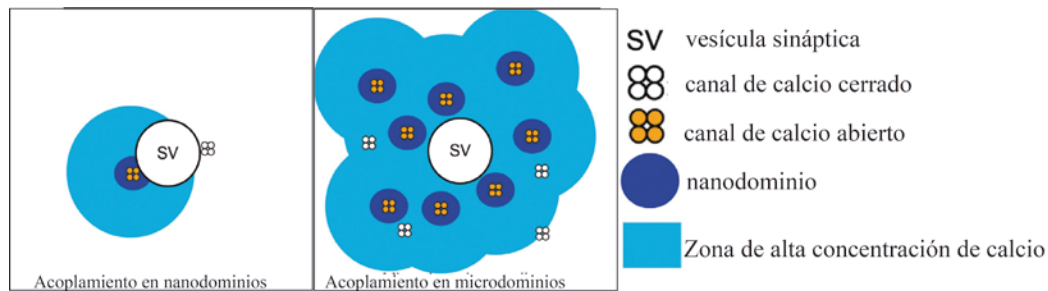
Los resultados parecen indicar un mecanismo de equilibrio: “dolor - no dolor” determinado en parte por la activación de “P2XR – P2YR”, esta relación de funciones antagónicas de los P2 ya ha sido propuesta anteriormente como mecanismo para regular la liberación de NTs (Rodrigues, Almeida et al. 2005, Heinrich, Kittel et al. 2008). Esta teoría se basa en el conocimiento de que P2XR induce la liberación de neurotransmisor excitador o de agentes inflamatorios y porque los P2YR se asocia a un aumento de la actividad de canales de rectificación interna de potasio ( $K_{IR}$ ) que disminuye el umbral de excitación neuronal y a una inhibición de la liberación de NT (McLarnon, Zhang et al. 1999, Mendoza-Fernandez, Andrew et al. 2000). Nos propusimos averiguar si en este equilibrio también existía en la regulación de activación - inhibición del transportador GlyT2, para ello estimulamos el cultivo con dosis crecientes de ATP y ADP. Los resultados confirmaron efectos contrarios para cada uno de los tratamientos sobre la actividad de GlyT2, de modo que el ATP activa el transporte de manera dosis dependiente, mientras que el ADP lo inhibe de forma significativa solo a altas concentraciones. Este resultado, apoya la teoría de que la neurotransmisión glicinérgica es modulada por la actividad de los P2. Sin embargo, es llamativo que sea necesaria una concentración tan elevada de ADP, lo que quizá implica la batería de ectoenzimas que metabolizan estos compuestos. Hay que considerar que en condiciones fisiológicas normales, no hay señalización nociceptiva, por lo que es posible que la acción antinociceptiva de los P2Y modulando a GlyT2 solo sea posible valorarla si la comparamos con un proceso doloroso. Además, los P2YR son receptores asociados a proteínas G (CRGP), y la actividad de los CRGP es, a menudo, difícil de predecir, ya que existen múltiples interacciones que modifican la cascada de señalización del receptor (Maggio, Innamorati et al. 2007). También es posible que los P2 que

responden a ADP activen distintas vías con funciones opuestas y que no estamos diferenciando en este ensayo.

### **3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTRE P2X3 Y GLYT2.**

Actualmente no se ha averiguado cómo la inhibición de estos receptores desencadena un efecto antinociceptivo, aunque cada vez se conoce más sobre la señalización molecular que pone en marcha la activación de P2X3 y P2X2/3. El flujo de iones calcio a través de P2X3 activa a PKC, y esta, a la proteína G monomérica H-Ras. H-Ras está unida a la membrana mediante prenilación en balsas lipídicas junto a P2X3 y caveolina 1A y media la endocitosis del receptor en endosomas de transporte retrogrado donde se ha detectado colocación de Rab7, P2X3, H-Ras, pMEK y pERK; el receptor llega así hasta el núcleo de la neurona sensorial, donde se cree que podría activar la expresión génica ya que se ha detectado un aumento de pCREB (Chen, Wang et al. 2012). Hemos analizado la importancia de algunas de estas quinasas en la regulación de P2X3 y efectivamente es imprescindible su función para que aumente la actividad de GlyT2. La quinasa PKC potencia las corrientes de calcio provocadas por P2X3, mientras que la actividad de CSK y Cdk5 disminuye o inhibe las corrientes. Estas quinasas funcionan en un delicado equilibrio (D'Arco, Giniatullin et al. 2007, D'Arco, Giniatullin et al. 2009, Nair, Simonetti et al. 2010), por lo que es de esperar que la inhibición de PKC impida la actividad normal del receptor. Además, la presencia de inhibidores de PKC aumenta la actividad del transportador ya que impide la endocitosis por ubiquitinación de GlyT2 (de Juan-Sanz, Zafra et al. 2011, de Juan-Sanz, Nunez et al. 2013a). La inhibición de MEK y ERK también impide la regulación del  $\beta\gamma$ -meATP sobre el transportador, sin embargo, no se ha detectado el aumento de pERK en cultivos estimulados con  $\beta\gamma$ -meATP, por lo que se ha descartado la necesidad de la expresión de nuevos genes en la neurona sensorial para la activación de GlyT2.

El mecanismo más conocido de P2X3 es el aumento de calcio citosólico, esta entrada de calcio provoca la fusión local de vesículas sinápticas (Meriney, Umbach et al. 2014), como se deduce de la presencia de quelantes de calcio, esta primera fase es esencial para la señalización entre P2X3 y GlyT2. Además, los receptores se encuentran asociados a CASK y a canales de Calcio P/Q (Gnanasekaran, Sundukova et al. 2013a, Gnanasekaran, Bele et al. 2013b), así, la entrada de calcio a través de P2X, puede activar localmente a estos canales y desencadenar un cambio de potencial de membrana y la liberación de glutamato y ATP (Kumar, Cherkas et al. 2012, Tarr, Dittrich et al. 2013).



Progress in Neurology (2014) 121:55-90

**Figura d1. Liberación local de vesículas sinápticas.** La liberación de una vesícula sináptica, puede desencadenarse por la activación de muy pocos canales de  $Ca^{2+}$ . A) Cada canal de calcio está estrechamente acoplada a una vesícula sináptica (acoplamiento de nanodominio). B) Varios canales pueden organizarse y agruparse, desencadenando liberación de vesículas sinápticas incluso durante un potencial de acción.

En los experimentos de medida de liberación de glutamato, vemos que hay un aumento sutil no significativo de este neurotransmisor tras la estimulación con  $\beta\gamma$ -meATP, parece que esto es suficiente para regular a la interneurona glicinérgica. En los resultados vemos que la inhibición del receptor de glutamato NMDA no impide el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP pero si lo minimiza, lo que indica que participan amplificando la señal. La inhibición de los receptores AMPA/Kainato revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, hemos confirmado que en presencia de este antagonista hay una activación del receptor P2X3 en el momento de la estimulación (fase I), pero no llega a producirse la respuesta de calcio posterior de la fase II. Los canales asociados con el receptor NMDA se encuentran habitualmente bloqueados por magnesio, de tal forma, que los estímulos dolorosos son transmitidos al SNC a través de los receptores AMPA, estableciéndose una vía de transmisión basal de la información dolorosa. Si el estímulo nocivo persiste, se produce despolarizaciones que eliminan el bloqueo de magnesio del canal ligado al receptor NMDA. Esta activación del complejo NMDA conlleva una despolarización masiva neuronal que se añade a la activación basal ya existente. Se cree que este mecanismo desempeña un papel primordial en los estados de algesia prolongada (Dickenson, Chapman et al. 1997). Según la distribución histológica de las dos proteínas, es posible que la regulación exista a nivel local axo-axónico, y que se produzca un aumento de la cantidad de GlyT2 en la membrana del terminal sináptico por la actividad de los receptores AMPA/Kainato, este aumento es mayor cuando además se activan los receptores NMDA.

La discreta liberación de glutamato se debe a la actividad de los receptores P2X3 (Kumar, Cherkas et al. 2012), las fibras sensoriales C no peptidérgicas llegan a las astas dorsales de la médula espinal y sinaptan sobre algunos somas de interneuronas inhibitoras en la lámina III y

especialmente en la lámina II donde se discurren los axones de neuronas glicinérgicas (Basbaum, Bautista et al. 2009, Foster, Wildner et al. 2015). La inhibición de los canales de  $Ca_v T$  y  $Ca_v N$ , impide la activación de GlyT2, estos canales se localizan en el terminal presináptico de fibras C y regulan la liberación de glutamato y otros péptidos en las astas dorsales de la médula espinal (Jacus, Uebele et al. 2012). El glutamato liberado por las fibras C activa los receptores AMPA/Kainato de la interneurona, a continuación la acción de los receptores NMDA da lugar a la despolarización de la interneurona glicinérgica (pA) y posteriormente la activación del transportador. La TTX inhibe a canales de  $Na^+$  1.6 que no están presentes en las fibras nociceptivas, y su presencia revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, por lo que proponemos que se origina un pA en la interneurona glicinérgica. Esta conclusión se ve reforzada por el aumento detectado en la liberación de glicina y en la respuesta postsináptica. Está descrito que la despolarización de la interneurona glicinérgica provoca el aumento transitorio de la presencia de GlyT2 en membrana y su posterior endocitosis (Geerlings, Nunez et al. 2001), sin embargo, en el caso del efecto descrito en este trabajo, el transportador no es endocitado después de su llegada a membrana como revela su estado de ubiquitinación, y permanece en membrana de manera activa hasta el máximo tiempo ensayado (90 minutos).

En varias ocasiones se ha propuesto que en situación de dolor las neuronas inhibitoras se desensibilizaban por activación de canales de potasio de rectificación interna ( $K_{IR}$ ) y de esta manera se impedía la actividad inhibitora sobre las vías glutamatérgicas (McLarnon, Zhang et al. 1999). Pero el proceso de regulación nociceptiva de la neurotransmisión inhibitora aquí descrito, requiere de canales de calcio dependientes de voltaje P/Q, que son los canales más abundantes en el SN, que además de asociarse a P2X3 y amplificar la señal, son responsables de la liberación de neurotransmisores en la zona activa de la presinapsis (Bertolino and Llinas 1992). De los resultados de transporte en presencia de antagonistas de canales iónicos proponemos que es necesaria la despolarización neuronal y la recuperación del potencial de reposo con la actividad de canales de sodio y de potasio, y que la inhibición de los  $K_{IR}$  con tertiapin no impide la señalización, por lo que descartamos que en este proceso la neurona inhibitora esté inactiva. Este resultado explica el efecto de bicuculina, el antagonista de receptores  $GABA_A$ , que revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP por la inhibición que ejerce este reactivo sobre los canales de potasio dependientes de calcio ( $SK_{Ca}$ ).

En la médula espinal, P2X3 induce la hiperalgesia termal y la alodinia mecánica, mediante un mecanismo en el que participan los receptores de glutamato y el óxido nítrico (Fukuhara, Imai et al. 2000, Martucci, Trovato et al. 2008). Adicionalmente el receptor P2Y1, inhibe a GlyT2



mediante la producción de ON y la vía del GMPc sin alterar la cantidad de transportador en membrana (Jimenez, Zafra et al. 2011).

El ON está involucrado tanto en la señalización nociceptiva como en la analgesia. Ante un estímulo doloroso la nNOS es la enzima principal de producción de ON (acompañada por iNOS), algunos autores han descrito que el uso de antagonistas de GMPc o de quelantes de ON tiene efecto antinociceptivo en animales con dolor inflamatorio o neuropático (Luo and Cizkova 2000). Durante el dolor inflamatorio, la nNOS se sobreexpresa en interneuronas inhibitorias, mientras que en el dolor neuropático por lesión periférica, nNOS se sobreexpresa en DRG y aumenta la liberación de ON en las astas dorsales de la médula espinal, por lo que nNOS parece ser responsable de la sensibilización (Zhang, Verge et al. 1993, Luo, Chaplan et al. 1999, Maihofner, Euchenhofer et al. 2000, Chu, Guan et al. , Guan, Yaster et al. 2007). Sin embargo hay claros indicios de un papel protector de nNOS ya que su eliminación génica, conlleva un aumento de la muerte neuronal tras una lesión nerviosa (Keilhoff, Fansa et al. 2002). Por otro lado, varios autores demuestran que la administración de precursores de ON reduce la excitabilidad de las fibras sensoriales (Haley, Dickenson et al. 1992, Zhuo, Meller et al. 1993) y la administración de análogos de GMPc reduce el dolor inflamatorio (Iwamoto and Marion 1994). Además en experimentos de electrofisiología se ha visto que la administración de GMPc y de donadores de ON sobre rodajas de médula espinal, inhibe la excitabilidad de las láminas superiores de las astas dorsales (Pehl and Schmid 1997), adicionalmente, la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5), que media la hidrólisis del GMPc, también reduce el dolor inflamatorio (Torres-Lopez, Arguelles et al. 2002). Es difícil determinar qué papel juegan las diferentes NOS en dolor, ya que la interrupción génica de una de las isoformas, va acompañada de una compensación por sobreexpresión de las otras (Tao, Tao et al. 2003, Boettger, Uceyler et al. 2007). En todo caso, el papel antinociceptivo del ON viene desencadenado por la ruta del ON – GCs – GMPc – PKG (Zhang, Quock et al. 2011).

Nuestros resultados indican que es necesaria la producción de ON para la activación de GlyT2, ya que quelantes de ON e inhibidores de nNOS (L-NAME, CPTIO y STMC) revierten el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. Sin embargo, los mensajeros derivados de la vía del GMPc no están implicados en la activación del transportador, ya que la adición de un análogo de GMPc (8-Br-GMPc) disminuye significativamente la actividad de GlyT2 y el tratamiento con dipiridamole que aumenta la cantidad de GMPc mediante la inhibición de la PDE-5 (enzima que hidroliza el GMPc), revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. Además, el agonistas del receptor mGlu3 (NAAG) aumenta de manera significativa la actividad de GlyT2 y esta descrito que la actividad de estos

receptores regula negativamente a GMPc (Wroblewska, Wegorzewska et al. 2011). Sin embargo, el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP se pierde o disminuye, según la concentración de NAAG, lo que parece indicar que la activación del transportador a través de P2X3 no está relacionada con el GMPc, ya que además, la inhibición de la PKG, principal diana del GMPc, no revierte el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP.

El ON puede también actuar mediante modificaciones postraduccionales de las proteínas que están implicadas en la neurotransmisión y en la liberación de vesículas sinápticas. Estas modificaciones consisten en la reacción de ON con los grupos tiol libres de la proteína formando S-nitrosilaciones o por nitración de tirosinas. La S-nitrosilación es una modificación reversible, varios miembros del complejo de proteínas SNARE como SNAP25, Munc-18 o syntaxina 1 (mediadores de la fusión de vesículas con la membrana, por ejemplo, en exocitosis de vesículas sinápticas) sufren S-nitrosilaciones, la nitrosilación de syntaxina 1 en su residuo Cys-145, impide su interacción con Munc18 y exocitosis de vesículas de manera reversible (Lavender, Chong et al. 2008). SNAP25 y Munc18 pueden llegar a sufrir nitraciones en tirosinas, lo que les impide de manera irreversible formar el complejo para la exocitosis de vesículas sinápticas, lo que inhibe de manera permanente la liberación de neurotransmisor (Di Stasi, Mallozzi et al. 2002). Además, se ha descrito que algunos transportadores de neurotransmisores como el de dopamina (DAT), de serotonina (SERT) y de colina (CHT) sufren nitrosilaciones en residuos extracelulares que inhiben su actividad (Park, Ferrer et al. 2002, Bryan-Lluka, Papacostas et al. 2004, Cuddy, Gordon et al. 2012). Otras proteínas, como el receptor transmembrana Fas, se nitrosila en un residuo citosólico que implica un desplazamiento del receptor a balsas lipídicas y un aumento de la actividad del mismo (Leon-Bollotte, Subramaniam et al. 2011).

Los experimentos de biotinylación de grupos tiol nitrosilados, indican la posibilidad de que GlyT2 pueda ser modificado por S-nitrosilación, sin embargo es difícil de asegurar, ya que sus 22 cisteínas y la fragilidad de esta modificación dificultan la especificidad del experimento.

Sabemos que la aplicación de donadores de ON (SNP) desencadenan la inhibición de GlyT2 vía GMPc (Jimenez, Zafra et al. 2011), por lo que para continuar con nuestra investigación nos remontamos a los efectos que  $\beta\gamma$ -meATP inducía en el cultivo: hemos atribuido el aumento de liberación de glutamato a la neurona sensorial por la activación de P2X3 y la potenciación del transportador a su llegada a membrana por activación de receptores de glutamato y liberación de vesículas, es de destacar que la mera aplicación de glutamato no mimetiza el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP, por lo que es necesario algún mensajero adicional. Todo

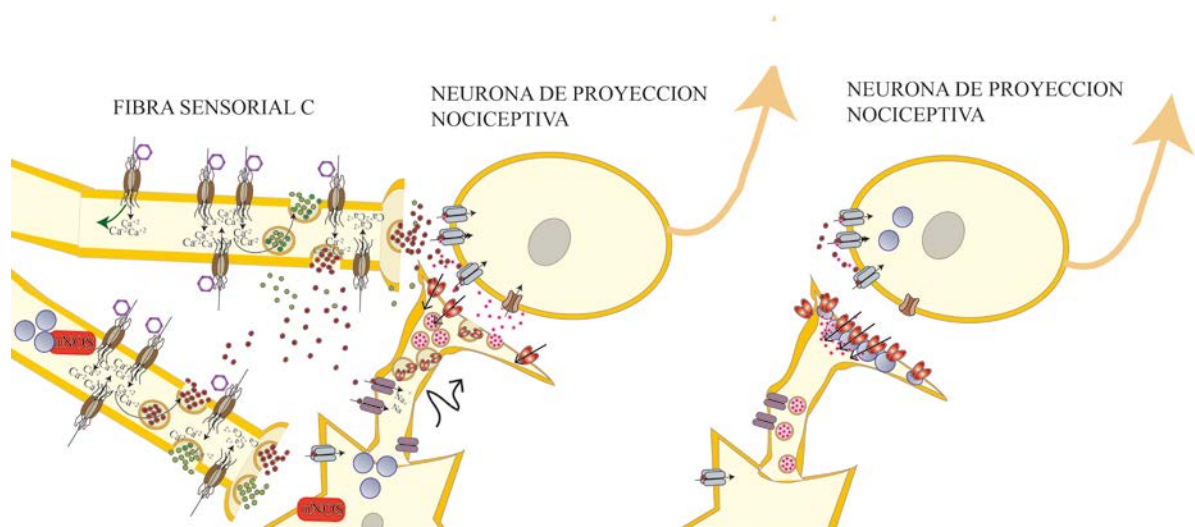
parece indicar que el ON participa. Además, hemos detectado que en la denominada fase I hay un aumento de la liberación de glicina.

Durante el transporte de glicina, GlyT2 sufre modificaciones conformacionales que pueden afectar a sus características, por lo que se analizaron los efectos del ON mediante la aplicación de SNP en presencia de sus sustratos: glicina, sodio y cloruro. Los resultados revelaron que en estas condiciones el óxido nítrico aumenta el transporte de GlyT2 y su presencia en membrana mimetizando los efectos de  $\beta\gamma$ -meATP. Esto es un importante indicio de que en presencia de glicina el ON actúa mediante modificaciones postraduccionales y no por la vía del GMPc. En todo caso, la posible S-nitrosilación del transportador o de alguna de las proteínas que interaccionan con él, implicaría, al menos, a Cys-3 de GlyT2, ya que el transportador mutante de sustitución de esta cisteína transfectado en COS7 revierte el efecto del óxido nítrico en presencia de glicina, mientras que los demás mutantes y el transportador silvestre sí respondieron al estímulo (glicina + SNP) potenciando el transporte.

Las evidencias que revelan la importancia de las modificaciones S-nitrosilación y nitración en las proteínas son abundantes, ya que puede modificar funciones tan importantes como actividades mitocondriales, el plegamiento de proteínas, la ubiquitinación, la transmisión sináptica, y otras vías de transducción de señales. La alteración de uno o varios de estos mecanismos puede contribuir a la disfunción neuronal y al desarrollo de enfermedades.

GlyT2 es una de las proteínas de expresión rápida en el fenómeno de sensibilización a largo plazo (LTP) (Herdegen, Holmes et al. 2014), que además, puede ser desencadenado por un aumento de glicina extracelular durante un periodo de 3 minutos (Lu, Man et al. 2001, Jaafari, Henley et al. 2012), por lo que es posible que el ON u otra molécula de señalización de P2X3 - P2X2/3 actúe además activando la ruta de las MAPK, (MEK/ERK) que podría, finalmente, aumentar la expresión de GlyT2.

En la figura d2, se representa la ruta de señalización propuesta entra P2X3R y GlyT2.



**Fase I:** despolarización de la neurona glicinérgica, liberación de glicina, llegada de GlyT2 a membrana, síntesis de ON.

**Fase II:** nitrosilación y permanencia de GlyT2 en membrana.

- $\beta\gamma$ -meATP.
- P2X3r.
- Terminal presináptico.
- Vesícula sináptica con NT glutamato.
- Vesícula sináptica con ATP.
- Sintasa de óxido nítrico (ON).
- Receptor de glutamato NMDA unido a glicina v glutamato en su conformación activa.
- Receptor de glutamato AMPA (soma) / Kainato (axon).
- GlyT2.
- Vesícula con transportador GlyT2.
- Vesícula sináptica con NT glicina.
- pA: despolarización de la interneurona.

**Figura d2. Vía de señalización propuesta entre P2X3 y GlyT2.** La unión de P2X3 a su agonista  $\beta\gamma$ -meATP aumenta la concentración de calcio en la fibra sensorial, lo que lleva a la fusión de vesículas sinápticas con glutamato y ATP. El glutamato, se une a sus receptores AMPA / Kainato y NMDA en la interneurona glicinérgica despolarizándola y desencadenando un pA que induce la exocitosis de vesículas sinápticas glicinérgicas y del transportador GlyT2. El flujo de calcio a través de P2X3 o por la activación de los receptores NMDA de la interneurona glicinérgica activa a nNOS, que sintetiza ON casi simultáneamente a la liberación de glicina desde el terminal de la interneurona. La conformación activa del transportador y el entorno, posibilitan que el ON reaccione con GlyT2 o con una proteína asociada a su extremo N-terminal y la nitrosile, esta nitrosilación favorece a la permanencia del transportador en membrana.

#### **4. GLYT2 COMO POSIBLE DIANA TERAPEUTICA EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR.**

El ATP, puede actuar como neuromodulador regulando la liberación de glutamato (Rodrigues, Almeida et al. 2005, Heinrich, Kittel et al. 2008), acetilcolina (Boue-Grabot, Barajas-Lopez et al. 2003), GABA (Hugel and Schlichter 2000, Boue-Grabot, Toulme et al. 2004) y glicina en las terminaciones nerviosas. Además, la actividad de varios receptores interacciona con el sistema purinérgico, como por ejemplo: los receptores de acetilcolina (mACh), de serotonina, de adrenalina, el sistema de cannabinoides, y el sistema gabaérgico. Hemos querido investigar cómo afecta a la regulación descrita, la modulación de otras vías conocidas por participar positiva o negativamente en la transmisión del dolor, con el fin de determinar si la potenciación de GlyT2 es, al igual que P2X3, un mecanismo común en la señalización nociceptiva.

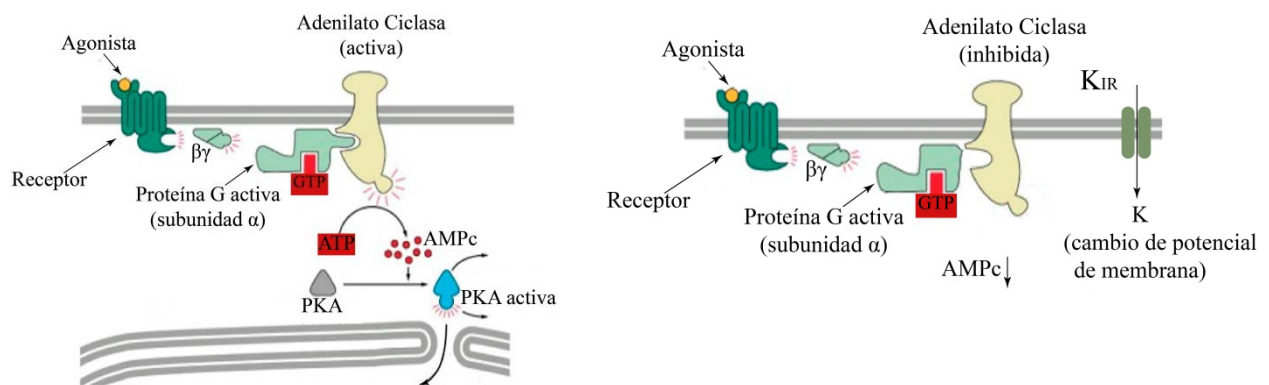
La interacción entre los P2 y los receptores colinérgicos se ha descrito fundamentalmente en el SN autónomo regulando tejidos secretores. Además, la actividad de los receptores muscarínicos es capaz de potenciar o inhibir las corrientes postsinápticas inhibitoras en las astas dorsales de la médula espinal contribuyendo a la señalización somatosensorial (Wang, Zhang et al. 2006, Zhang, Zhou et al. 2007), sin embargo, el agonista de mACh carbacol no tiene efectos sobre la actividad de GlyT2 y no interacciona con la ruta propuesta entre P2X3-GlyT2.

Los receptores GABA<sub>B</sub>, pueden localizarse tanto en el terminal postsináptico como en la presinapsis, su actividad está asociada a una inhibición de la liberación de neurotransmisor (Yang, Ma et al. 2015) y su participación en la señalización nociceptiva está condicionada por su localización y factores del entorno (McCarson, Ralya et al. 2005, Kasten and Boehm 2015). El uso de baclofen, un antagonista de GABA<sub>B</sub>, potencia por si solo al transportador, sin embargo, impide la potenciación de GlyT2 por  $\beta\gamma$ -meATP, lo que sugiere que estas dos vías de señalización interfieren. Los receptores asociados a proteínas G (GPCR) como los de opiáceos o serotonina entre otros, también modulan tanto las respuestas de los P2XR como la actividad glicinérgica (Boue-Grabot, Barajas-Lopez et al. 2003, Boychuk, Bateman et al. 2011, Chizhnikov, Kulyk et al. 2015), sin embargo, el estudio de todos estos receptores debe realizarse en un trabajo a parte de manera cuidadosa y detallada, ya que un mismo receptor puede desencadenar diferentes respuestas que dependen de muchos factores (Maggio, Innamorati et al. 2007, Grammatopoulos 2017). Es de destacar, que muchos de los reactivos que disparan la actividad de GlyT2, activan receptores asociados a proteínas G (GPCR) que pueden

localizarse tanto en la interneurona glicinérgica, como en la fibra sensorial o en células adyacentes. Para sentar las bases que ayuden a esclarecer el funcionamiento de GlyT2 en la señalización del dolor, se realizaron experimentos de transporte interfiriendo en las distintas cascadas que se activan o inhiben en respuesta a estas proteínas G.

Existen tres principales familias de proteínas G cuya funciones resumimos en la siguiente tabla:

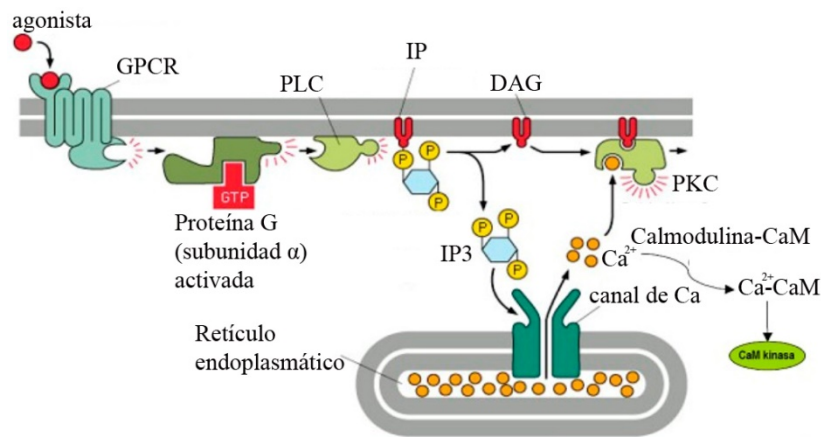
Familia	Miembros	Acción mediada por	Funciones
II	G <sub>S</sub>	α	Activa AC y canales de calcio
	G <sub>OLF</sub>	α	Activa adenilato ciclasa (AC) en neuronas
	G <sub>i</sub>	α βγ	Inhibe AC Activa canales de K
II	G <sub>O</sub>	Bγ Bγ y α	Activa canales de K; inhibe canales de Ca Activa fosfolipasa C (PLC)
	G <sub>T</sub>	α	Activa FDE de GMP bastones
III	G <sub>Q</sub>	α	Activa PLCβ



**Figura d3. PROTEINAS G $\alpha_{I/S}$ .** La proteína G $\alpha_s$  activadora, activa la adenilato ciclasa aumentando la cantidad de AMPc. El AMPc puede activar a PKA que desencadena varias funciones, entre ellas la expresión de nuevas proteínas. Las Proteínas G $\alpha_i/o$  inhiben la adenilato ciclasa y por consiguiente, disminuye la cantidad de AMPc. Además activan canales de K (K<sub>IR</sub>) que modifican el potencial de membrana.

La manipulación farmacológica de la cascada desencadenada por los GPCR asociados a proteínas G<sub>I/O</sub> y G<sub>S</sub> se llevó a cabo mediante la aplicación de forskolina (activador de AC), diburil-AMPc y H89 (inhibidor de PKA). Todos ellos disminuían la actividad del transportador sin interferir en la regulación entre P2X3 y GlyT2. Esto puede significar que el aumento de AMPc por actividad un receptor asociado a G<sub>S</sub> en la interneurona inhibidora disminuye la actividad de transporte de GlyT2 mediante PKA.

La subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína Gi/o activa a los canales  $K_{IR}$ , el tertiapin (antagonista de los  $K_{IR}$ ) no interfiere en el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP por lo que estos canales no participan en la señalización, es de destacar que la actividad de GlyT2 no se modifica en presencia de este inhibidor. De estos resultados podemos interpretar que la activación de GPCR - PrtGi, en la neurona glicinérgica, inhibirían a la AC y disminuiría el AMPc, por lo que podrían ejercer una regulación positiva sobre el transportador, aunque este mecanismo de potenciación de GlyT2, es diferente al desencadenado por P2X3. Este es el mecanismo de GABA<sub>B</sub>, el receptor EP3 de PGE2 y de mGlu3R, este último, ejerce además una regulación negativa de los niveles de GMPc favoreciendo aún más la potenciación del GlyT2. Este sería un mecanismo de regulación con el mismo resultado que la aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP, pero desencadenado por un mecanismo diferente.



**Figura d4. PROTEINAS G $\alpha_q$ .** La subunidad  $\alpha$  de las proteínas G $Q$  activa a la fosfolipasa C (PLC), que a su vez, activa a fosfolipasa 2 (PLA2) y ésta induce la síntesis de ácido araquidónico (AA). El AA da lugar a la formación de prostanooides a través de la enzima COX2. Los prostanooides desencadenan la respuesta inflamatoria que posteriormente pueden transformarse en endocannabinoides, conocidos por sus propiedades analgésicas (GPCR: receptor acoplado a proteína G. PLC: fosfolipasa c. IP: fosfatidilinositol. DAG: diacilglicerol. PKC: proteína quinasa C. IP3: inositol trifosfato)

Nuestros resultados indican que la inhibición de PLC da lugar a una reversión del efecto de  $\beta\gamma$ -meATP y a una brusca disminución de la actividad del transportador, seguramente debida a la alteración de fosfolípidos de membrana. PLC puede activar a PLA2 y la activación de PLA2 no reproduce el efecto de  $\beta\gamma$ -meATP. La PLA2, induce la síntesis de AA, el cual a alta concentración podría inhibir al transportador de glicina (Zafra, Alcantara et al. 1990). Sin embargo, los prostanooides activan a GlyT2 y los endocannabinoides, inhiben a los transportadores dependientes de sodio en general y el endocannabinoide NAGly inhibe a GlyT2 en particular (Edington, McKinzie et al. 2009). Por otro lado, la PLC también hidroliza

fosfolípidos de membrana con la consecuente activación del receptor IP3 localizado en el retículo endoplásmico que libera  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma celular activando a PKC y otras rutas. La inhibición de IP3R no tiene efectos sobre GlyT2 pero revierte su activación por  $\beta\gamma$ -meATP.

Estos resultados sugieren que la actividad de  $G_Q$  no potencia el transporte de GlyT2 cuando se activa en la propia interneurona e interferir con la ruta de P2X3 – GlyT2. Es posible que esto se deba a una modificación del patrón de fosfolípidos de membrana por parte de PLC, alteración a la que son especialmente sensibles los P2XR (Mo, Bernier et al. 2009). De los resultados con SP, un péptido que se une al NK-1R (GPCR asociado a  $G_Q$ ) se sugiere que la activación de esta vía en una neurona peptidérgica cercana sí podría activar al transportador.

Con estos resultados proponemos concluir que la actividad de  $G_{\alpha i}$  en la neurona glicinérgica estimularía el transportador acompañado de una situación de dolor, la activación de  $G_{\alpha s}$  en la interneurona glicinérgica disminuiría parcialmente la actividad de GlyT2 y probablemente favoreciendo así la analgesia. Y la actividad de  $G_{\alpha Q}$  en una célula próxima a la interneurona glicinérgica, podría activar a GlyT2 mediante la liberación de segundos mensajeros. Los datos discutidos en este apartado, sientan una base de estudio del dolor con GlyT2 como una de las proteínas necesarias para esta patología, que actualmente no tiene solución en los casos más graves de dolor neuropático.



# CONCLUSIONES

1. La activación del transporte de GlyT2 constituye una respuesta común a los distintos tratamientos pronociceptivos empleados en cultivos primarios neuronales de médula espinal de rata.
2. Se ha establecido la selectividad del análogo de ATP  $\beta\gamma$ -meATP como agonista de receptores que implican la subunidad P2X3 en células 1321N1 y neuronas.
3. La activación de receptores purinérgicos P2X3 produce una rápida pero estable estimulación del transporte y la expresión en superficie de GlyT2. La regulación es paracrina pues receptor y transportador no coinciden en localización celular.
4. El análogo de ATP  $\alpha\beta$ -meATP, descrito como específico de P2X3, es inestable y puede estimular receptores P2Y1 e inhibir a GlyT2.
5. La estimulación de GlyT2 por  $\beta\gamma$ -meATP se produce por activación de receptores homoméricos P2X3 y heteroméricos P2X2/3. El homómero P2X2 solo, no activa a GlyT2.
6. La activación de GlyT2 por estimulación de receptores P2X3 se produce a través de la vía de señalización mediada por ON que modifica al transportador mediante S-nitrosilación de su Cys-3 en presencia de sustratos extracelulares (sodio, cloruro y glicina).
7. GlyT2 tiene una regulación dual por ON que modula negativamente al transportador mediante la vía del GMPc o lo potencia mediante modificaciones postraduccionales de S-nitrosilación.
8. La aplicación de  $\beta\gamma$ -meATP aumenta la frecuencia y la amplitud de las sIPSCs glicinérgicas coincidiendo en el tiempo con un incremento de la liberación de glicina y un decaimiento posterior simultáneo al incremento del transporte de GlyT2.
9. La regulación de GlyT2 por receptores P2X3 es interferida por diversas cascadas de señalización implicadas en el procesamiento de la información nociceptiva.



## **RESUMEN.**

La glicina desempeña un papel dual en el sistema nervioso central de vertebrados, actuando como neurotransmisor inhibitor y modulando la neurotransmisión excitadora al actuar como coagonista obligado del receptor de glutamato tipo NMDA. La neurotransmisión mediada por glicina finaliza cuando es retirada de la hendidura sináptica por los neurotransportadores de glicina (GlyTs) presentes en las membranas plasmáticas de la glía adyacente (GlyT1) y en los botones presinápticos de neuronas glicinérgicas (GlyT2). Un aspecto de gran interés es el estudio de los transportadores de glicina en vías nociceptivas, ya que la red de interneuronas glicinérgicas localizadas en las astas dorsales de la médula espinal regulan la transmisión de la señal dolorosa desde la periferia a regiones superiores del cerebro, controlando el equilibrio entre la señal excitadora mediada por interneuronas glutamatérgicas y la señal inhibitora. El desequilibrio de este balance está en la base de la patología del dolor crónico tanto de tipo inflamatorio como neuropático.

En esta Tesis hemos ampliado el estudio de la regulación de GlyTs por receptores implicados en el procesamiento de la señal dolorosa en la médula espinal iniciado en el laboratorio mediante la demostración de que los receptores P2Y1 regulan de manera opuesta la actividad de GlyT1 y GlyT2. Esto contribuye al aumento de la función inhibitora y presumiblemente a los efectos anti-nociceptivos de este receptor. En este proyecto se estudia la regulación por otros receptores que en experimentos previos han demostrado capacidad de modulación de los GlyTs: receptores purinérgicos P2X3, cuya implicación en nocicepción en la médula espinal ha sido ampliamente demostrada. Para el estudio hemos utilizado cultivos primarios neuronales de médula espinal y células 1321N1 que poseen una mínima dotación basal de receptores purinérgicos. Hemos utilizado herramientas farmacológicas y de supresión génica con RNAi, medidas de microfluorimetría de calcio intracelular y técnicas bioquímicas convencionales para analizar la actividad de GlyT2 mediante ensayo de transporte de <sup>3</sup>[H]glicina y expresión en membrana mediante marcaje de superficie. Nuestros resultados indican que GlyT2 es activado por estimulación de receptores P2X2/3 y P2X3 y que el óxido nítrico está implicado en la señalización de P2X3 sobre GlyT2 favoreciendo su nitrosilación y aumentando su presencia en membrana tras su sobreexpresión. Se han explorado otras cascadas de señalización que interaccionan con la señalización de P2X3. Los estímulos pro-nociceptivos aumentan la actividad de GlyT2, lo que sugiere que la modulación del transportador tiene un papel destacado en el procesamiento de la señal nociceptiva.

## **SUMMARY.**

Glycine plays a dual role in the central nervous system of vertebrates, acting as an inhibitory neurotransmitter and modulating excitatory neurotransmission by acting as an obligate agonist of the NMDA glutamate receptor. Glycine-mediated neurotransmission is terminated by neurotransmitter reuptake by plasma membrane glycine transporters present in the plasma membranes of the adjacent glia (GlyT1) and in the presynaptic buttons of glycinergic neurons (GlyT2). GlyT1 and GlyT2 can modulate inhibitory glycine neurotransmission. One aspect of great interest is the study of glycine transporters in nociceptive pathways, since the network of glycinergic interneurons located in the dorsal horn of the spinal cord regulate the transmission of the pain signal from the periphery to upper regions of the brain, controlling the balance between the excitatory signal mediated by glutamatergic interneurons and the inhibitory signal. The imbalance of this equilibrium lies at the basis of chronic inflammatory and neuropathic pain pathology.

In this thesis we have expanded the study of the regulation of the GlyTs by receptors involved in the processing of the pain signal in the spinal cord initiated in the laboratory by demonstrating that the P2Y1 receptors oppositely regulate the activity of GlyT1 and GlyT2. This contributes to the increase of the inhibitory function and presumably to the anti-nociceptive effects of this receptor. In this work we study the regulation by other receptors that in previous experiments have shown the ability to modulate the GlyTs: purinergic receptors P2X3, whose implication in nociception in the spinal cord has been amply demonstrated. For this study we used primary spinal cord neurons and 1321N1 cells that contain a minimal basal endowment of purinergic receptors and used pharmacological and gene suppression RNAi tools, microfluorimetric determinations of intracellular calcium concentration and conventional biochemical techniques to analyze the activity of GlyT2 by <sup>3</sup>[H] glycine transport assays and membrane expression by surface labeling. Our results indicate that GlyT2 is activated by stimulation of P2X2 / 3 and P2X3 receptors and that nitric oxide is involved in P2X3 signaling on GlyT2 favoring its nitrosylation and increasing its membrane presence after transporter overexpression. Other signaling cascades interacting with P2X3 signaling have been explored. Pro-nociceptive stimuli increase GlyT2 activity, suggesting that modulation of the transporter plays a prominent role in the processing of the nociceptive signal.

# **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer a las Doctoras Beatriz López y Carmen Aragón haber tenido la experiencia de trabajar en su laboratorio. Gracias a la Doctora Beatriz López por darme la oportunidad de realizar la tesis en el laboratorio bajo su tutela, creo que no hay espacio suficiente en una tesis para expresar lo agradecida que estoy, no solo por brindarme la oportunidad de continuar con mi deseo de investigar, si no por hacerlo bajo la supervisión y enseñanza de dos investigadoras como vosotras: Beatriz y Carmen: buenas investigadoras, profesoras y personas, por ser un ejemplo a seguir en lo profesional y en lo personal, mis más sinceros agradecimientos.

También quiero agradecer a todos mis profesores, en especial a María Visitación Alonso, mi profesora de Biología en el instituto, y a Alicia Batuecas una de mis profesoras en la universidad, por haberme inyectado ganas de seguir estudiando. Y al profesor Eduardo Fernández Valiente por su ayuda desinteresada con el proyecto fin de carrera, es un gran profesor.

Gracias a la Doctora Beatriz Parra, del laboratorio central de Veterinaria de Algete, y al Doctor Alonso Miguel Higüero del laboratorio de Biología de membranas del Hospital Nacional de Paraplégicos, sois las personas de las que más he aprendido, muchas gracias.

Gracias a mi tía Pili por ayudarme a entrar en el maravilloso mundo de la neurociencia. Gracias al Doctor Pepe Abad por la oportunidad de trabajar en su laboratorio donde pude aprender las cosas buenas y malas de la ciencia. Gracias a Ernesto Doncel por enseñarme a mantenerme fiel a mis principios y no aceptar los méritos a cualquier precio.

A mis compañeros de Toledo por lo bien que lo pasamos: Alonso, Natalia, Silvia, Eva, Eider, Marcos, Javi, Josué y a todos los demás, seguro que me olvido de muchos, pero fue fantástico conocerlos; y en especial a la Doctora Natalia Diez, por apostar por mí y por nuestra amistad, y a la Doctora Silvia Velasco, por todos los días que me diste cobijo, por todas las cenas, las risas, las vacaciones, las locuras, gracias por haber aparecido en mi vida, la hiciste mucho más divertida.

A mis compañeros del CBMSO, por ser tan buena gente, creo que no hay mejor ambiente posible para trabajar que estando con vosotros. En especial, a la Doctora Esperanza Jiménez, siempre es agradable escucharte; a Cristina Benito y Esther Arribas, por compartir conmigo esta etapa de nuestras vidas. A los doctores Jaime de Juan y David Bartolomé por la ayuda y la colaboración ofrecida. Gracias también al Doctor Paco Zafra por su valiosa ayuda. A Alberto

Garrido, Almudena García, Ignacio Ibáñez, Lola Piniella, a todos los del laboratorio 303, 304, 306 y 307 por todo el material prestado, los consejos, las charlas y la compañía, habéis hecho que esta etapa sea genial. Gracias a Enrique Núñez por su paciencia y su trabajo, ¡y mucho ánimo para lo que te queda aún!

Gracias a mis compañeras y amigas: la Doctora Marta García-Arévalo, Elena de Agustín y Patria Sánchez, que tanto me ayudasteis cuando lo necesité, habéis sido las mejores compañeras que se puede tener, y me encanta teneros como amigas.

Gracias a mis amigas Itziar y Sara, vuestra amistad ha sido siempre el apoyo necesario para superar las dificultades de mi carrera y de mi vida, convirtiendo cualquier situación en algo para celebrar. Gracias a Alejandro Rejas Galeano por elegir estar a mi lado, por tu apoyo en mis decisiones, tu paciencia, tu humor, tu ayuda y por hacerme tan feliz.

A mis hermanas Almudena y Ana por ser las mejores hermanas que se puede tener. Gracias a Ana por todas sus correcciones, los cursos de informática y toda su ayuda, especialmente por las cañas al sol para desconectar. Gracias a Almudena por soportar mis momentos, por saber escuchar y por enseñarme mejor que nadie lo que significa la superación personal, eres un ejemplo de fortaleza para cualquiera de este planeta.

Y especialmente, gracias a mis padres, por enseñarme a elegir por mí misma, por ser tan divertidos, a mi padre por escucharme siempre; a mi madre por su ayuda incondicional, no sé qué sería de mí sin vosotros, gracias.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, M. T. Miras-Portugal, B. F. King, C. Gachet, K. A. Jacobson, G. A. Weisman and G. Burnstock (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." *Trends Pharmacol Sci* **24**(2): 52-55.
- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" *Pharmacol Ther* **64**(3): 445-475.
- Alfadhel, M., M. Nashabat, H. A. Qahtani, A. Alfares, F. A. Mutairi, H. A. Shaalan, G. V. Douglas, K. Wierenga, J. Juusola, M. T. Alrifai, S. T. Arold, F. Alkuraya and Q. A. Ali (2016). "Mutation in SLC6A9 encoding a glycine transporter causes a novel form of non-ketotic hyperglycinemia in humans." *Hum Genet* **135**(11): 1263-1268.
- Ando, R. D., B. Mehesz, K. Gyires, P. Illes and B. Sperlagh (2010). "A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain." *Br J Pharmacol* **159**(5): 1106-1117.
- Apostolides, P. F. and L. O. Trussell (2013). "Rapid, activity-independent turnover of vesicular transmitter content at a mixed glycine/GABA synapse." *J Neurosci* **33**(11): 4768-4781.
- Aragon, C. and B. Lopez-Corcuera (2003). "Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters." *Eur J Pharmacol* **479**(1-3): 249-262.
- Aragon, C. and B. Lopez-Corcuera (2005). "Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion." *Trends Pharmacol Sci* **26**(6): 283-286.
- Aschrafi, A., S. Sadtler, C. Niculescu, J. Rettinger and G. Schmalzing (2004). "Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes." *J Mol Biol* **342**(1): 333-343.
- Aubrey, K. R., A. D. Mitrovic and R. J. Vandenberg (2000). "Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b." *Mol Pharmacol* **58**(1): 129-135.
- Barajas-Lopez, C., R. Espinosa-Luna and Y. Zhu (1998). "Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons." *J Physiol* **513** ( Pt 3): 671-683.
- Barajas-Lopez, C., L. M. Montano and R. Espinosa-Luna (2002). "Inhibitory interactions between 5-HT3 and P2X channels in submucosal neurons." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(6): G1238-1248.
- Barclay, J., S. Patel, G. Dorn, G. Wotherspoon, S. Moffatt, L. Eunson, S. Abdel'al, F. Natt, J. Hall, J. Winter, S. Bevan, W. Wishart, A. Fox and P. Ganju (2002). "Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain." *J Neurosci* **22**(18): 8139-8147.
- Bardoni, R., P. A. Goldstein, C. J. Lee, J. G. Gu and A. B. MacDermott (1997). "ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord." *J Neurosci* **17**(14): 5297-5304.
- Barthel, F., A. Urban, L. Schlosser, V. Eulenburg, R. Werdehausen, T. Brandenburger, C. Aragon, I. Bauer and H. Hermanns (2014). "Long-term application of glycine transporter inhibitors acts antineuropathic and modulates spinal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR-1 expression in rats." *Anesthesiology* **121**(1): 160-169.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer and D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* **139**(2): 267-284.
- Begni, B., L. Tremolizzo, C. D'Orlando, M. S. Bono, R. Garofolo, M. Longoni and C. Ferrarese (2005). "Substrate-induced modulation of glutamate uptake in human platelets." *Br J Pharmacol* **145**(6): 792-799.
- Belai, A. and G. Burnstock (1994). "Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) inhibitory neurones in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle." *Cell Tissue Res* **278**(1): 197-200.
- Benarroch, E. E. (2015). "Ion channels in nociceptors: recent developments." *Neurology* **84**(11): 1153-1164.

- Benveniste, M. and M. L. Mayer (1991). "Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine." *Biophys J* **59**(3): 560-573.
- Bertolino, M. and R. R. Llinas (1992). "The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**: 399-421.
- Bian, X., J. Ren, M. DeVries, B. Schnegelsberg, D. A. Cockayne, A. P. Ford and J. J. Galligan (2003). "Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit." *J Physiol* **551**(Pt 1): 309-322.
- Bianchi, B. R., K. J. Lynch, E. Touma, W. Niforatos, E. C. Burgard, K. M. Alexander, H. S. Park, H. Yu, R. Metzger, E. Kowaluk, M. F. Jarvis and T. van Biesen (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-138.
- Bleehen, T. and C. A. Keele (1977). "Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation." *Pain* **3**(4): 367-377.
- Bodin, P. and G. Burnstock (1998). "Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation." *Inflamm Res* **47**(8): 351-354.
- Bodin, P. and G. Burnstock (2001). "Purinergic signalling: ATP release." *Neurochem Res* **26**(8-9): 959-969.
- Boettger, M. K., N. Uceyler, M. Zelenka, A. Schmitt, A. Reif, Y. Chen and C. Sommer (2007). "Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice." *Eur J Pain* **11**(7): 810-818.
- Boue-Grabot, E., V. Archambault and P. Seguela (2000). "A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels." *J Biol Chem* **275**(14): 10190-10195.
- Boue-Grabot, E., C. Barajas-Lopez, Y. Chakfe, D. Blais, D. Belanger, M. B. Emerit and P. Seguela (2003). "Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels." *J Neurosci* **23**(4): 1246-1253.
- Boue-Grabot, E., E. Toulme, M. B. Emerit and M. Garret (2004). "Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels." *J Biol Chem* **279**(50): 52517-52525.
- Boychuk, C. R., R. J. Bateman, K. E. Philbin and D. Mendelowitz (2011). "alpha1-adrenergic receptors facilitate inhibitory neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus." *Neuroscience* **193**: 154-161.
- Bradbury, E. J., G. Burnstock and S. B. McMahon (1998). "The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor." *Mol Cell Neurosci* **12**(4-5): 256-268.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel neuronal messenger." *Neuron* **8**(1): 3-11.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." *Annu Rev Biochem* **63**: 175-195.
- Breza, J. M. and S. P. Travers (2016). "P2X2 Receptor Terminal Field Demarcates a "Transition Zone" for Gustatory and Mechanosensory Processing in the Mouse Nucleus Tractus Solitarius." *Chem Senses* **41**(6): 515-524.
- Brown, S. G., A. Townsend-Nicholson, K. A. Jacobson, G. Burnstock and B. F. King (2002). "Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH." *J Pharmacol Exp Ther* **300**(2): 673-680.
- Bryan-Lluka, L. J., M. H. Papacostas, F. A. Paczkowski and J. C. Wanstall (2004). "Nitric oxide donors inhibit 5-hydroxytryptamine (5-HT) uptake by the human 5-HT transporter (SERT)." *Br J Pharmacol* **143**(1): 63-70.
- Burnstock, G. (1981). "Pathophysiology of migraine: a new hypothesis." *Lancet* **1**(8235): 1397-1399.
- Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." *Cell Mol Life Sci* **64**(12): 1471-1483.
- Burnstock, G. (2013). "Purinergic mechanisms and pain--an update." *Eur J Pharmacol* **716**(1-3): 24-40.
- Burnstock, G. (2017). "Purinergic Signaling in the Cardiovascular System." *Circ Res* **120**(1): 207-228.
- Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor?" *Gen Pharmacol* **16**(5): 433-440.
- Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." *Int Rev Cytol* **240**: 31-304.



- Calvert, J. A. and R. J. Evans (2004). "Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice." *Mol Pharmacol* **65**(1): 139-148.
- Carland, J. E., C. A. Handford, R. M. Ryan and R. J. Vandenberg (2014). "Lipid inhibitors of high affinity glycine transporters: identification of a novel class of analgesics." *Neurochem Int* **73**: 211-216.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-824.
- Centemeri, C., C. Bolego, M. P. Abbracchio, F. Cattabeni, L. Puglisi, G. Burnstock and S. Nicosia (1997). "Characterization of the Ca<sup>2+</sup> responses evoked by ATP and other nucleotides in mammalian brain astrocytes." *Br J Pharmacol* **121**(8): 1700-1706.
- Cizkova, D., N. Lukacova, M. Marsala and J. Marsala (2002). "Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn." *Brain Res Bull* **58**(2): 161-171.
- Clements, J. D. and G. L. Westbrook (1991). "Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor." *Neuron* **7**(4): 605-613.
- Cockayne, D. A., P. M. Dunn, Y. Zhong, W. Rong, S. G. Hamilton, G. E. Knight, H. Z. Ruan, B. Ma, P. Yip, P. Nunn, S. B. McMahon, G. Burnstock and A. P. Ford (2005). "P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP." *J Physiol* **567**(Pt 2): 621-639.
- Cockayne, D. A., S. G. Hamilton, Q. M. Zhu, P. M. Dunn, Y. Zhong, S. Novakovic, A. B. Malmberg, G. Cain, A. Berson, L. Kassotakis, L. Hedley, W. G. Lachnit, G. Burnstock, S. B. McMahon and A. P. Ford (2000). "Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice." *Nature* **407**(6807): 1011-1015.
- Coleman, J. A., E. M. Green and E. Gouaux (2016). "Thermostabilization, Expression, Purification, and Crystallization of the Human Serotonin Transporter Bound to S-citalopram." *J Vis Exp*(117).
- Collado-Alsina, A., J. Ramirez-Franco, J. Sanchez-Prieto and M. Torres (2014). "The regulation of synaptic vesicle recycling by cGMP-dependent protein kinase type II in cerebellar granule cells under strong and sustained stimulation." *J Neurosci* **34**(26): 8788-8799.
- Collier, H. O., G. W. James and C. Schneider (1966). "Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate." *Nature* **212**(5060): 411-412.
- Contestabile, A. (2000). "Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development." *Brain Res Brain Res Rev* **32**(2-3): 476-509.
- Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." *Nature* **424**(6951): 938-942.
- Coutaux, A., F. Adam, J. C. Willer and D. Le Bars (2005). "Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms." *Joint Bone Spine* **72**(5): 359-371.
- Cubelos, B., C. Gimenez and F. Zafra (2005a). "The glycine transporter GLYT1 interacts with Sec3, a component of the exocyst complex." *Neuropharmacology* **49**(6): 935-944.
- Cubelos, B., I. M. Gonzalez-Gonzalez, C. Gimenez and F. Zafra (2005b). "The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization." *J Neurochem* **95**(4): 1047-1058.
- Cuddy, L. K., A. C. Gordon, S. A. Black, E. Jaworski, S. S. Ferguson and R. J. Rylett (2012). "Peroxynitrite donor SIN-1 alters high-affinity choline transporter activity by modifying its intracellular trafficking." *J Neurosci* **32**(16): 5573-5584.
- Chen, C. C., A. N. Akopian, L. Sivilotti, D. Colquhoun, G. Burnstock and J. N. Wood (1995). "A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons." *Nature* **377**(6548): 428-431.
- Chen, S. R., H. Chen, W. X. Yuan, J. Wess and H. L. Pan (2010). "Dynamic control of glutamatergic synaptic input in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes defined using knockout mice." *J Biol Chem* **285**(52): 40427-40437.
- Chen, X. Q., B. Wang, C. Wu, J. Pan, B. Yuan, Y. Y. Su, X. Y. Jiang, X. Zhang and L. Bao (2012). "Endosome-mediated retrograde axonal transport of P2X3 receptor signals in primary sensory neurons." *Cell Res* **22**(4): 677-696.

- Chen, X. Q., J. X. Zhu, Y. Wang, X. Zhang and L. Bao (2014). "CaMKIIalpha and caveolin-1 cooperate to drive ATP-induced membrane delivery of the P2X3 receptor." *J Mol Cell Biol* **6**(2): 140-153.
- Chen, Y., G. Li and L. Y. Huang (2015). "p38 MAPK mediates glial P2X7R-neuronal P2Y1R inhibitory control of P2X3R expression in dorsal root ganglion neurons." *Mol Pain* **11**: 68.
- Chen, Y., G. W. Li, C. Wang, Y. Gu and L. Y. Huang (2005). "Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state." *Pain* **119**(1-3): 38-48.
- Chessell, I. P., J. P. Hatcher, C. Bountra, A. D. Michel, J. P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W. L. Peck, C. B. Grahames, M. A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand and G. N. Buell (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." *Pain* **114**(3): 386-396.
- Cheung, K. K. and G. Burnstock (2002). "Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis." *J Comp Neurol* **443**(4): 368-382.
- Chizhmakov, I., V. Kulyk, I. Khasabova, S. Khasabov, D. Simone, G. Bakalkin, D. Gordienko, A. Verkhatsky and O. Krishtal (2015). "Molecular mechanism for opioid dichotomy: bidirectional effect of mu-opioid receptors on P2X(3) receptor currents in rat sensory neurones." *Purinergic Signal* **11**(2): 171-181.
- Chow, Y. W. and H. L. Wang (1998). "Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase." *J Neurochem* **70**(6): 2606-2612.
- Chu, Y. C., Y. Guan, J. Skinner, S. N. Raja, R. A. Johns and Y. X. Tao (2005). "Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain." *Pain* **119**(1-3): 113-123.
- D'Arco, M., R. Giniatullin, V. Leone, P. Carloni, N. Birsa, A. Nair, A. Nistri and E. Fabbretti (2009). "The C-terminal Src inhibitory kinase (Csk)-mediated tyrosine phosphorylation is a novel molecular mechanism to limit P2X3 receptor function in mouse sensory neurons." *J Biol Chem* **284**(32): 21393-21401.
- D'Arco, M., R. Giniatullin, M. Simonetti, A. Fabbro, A. Nair, A. Nistri and E. Fabbretti (2007). "Neutralization of nerve growth factor induces plasticity of ATP-sensitive P2X3 receptors of nociceptive trigeminal ganglion neurons." *J Neurosci* **27**(31): 8190-8201.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle and J. Chen (2008). "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2): 317-364, table of contents.
- De Alba, J., N. M. Clayton, S. D. Collins, P. Colthup, I. Chessell and R. G. Knowles (2006). "GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain." *Pain* **120**(1-2): 170-181.
- de Juan-Sanz, J., E. Nunez, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2013a). "Constitutive endocytosis and turnover of the neuronal glycine transporter GlyT2 is dependent on ubiquitination of a C-terminal lysine cluster." *PLoS One* **8**(3): e58863.
- de Juan-Sanz, J., E. Nunez, L. Villarejo-Lopez, D. Perez-Hernandez, A. E. Rodriguez-Fraticelli, B. Lopez-Corcuera, J. Vazquez and C. Aragon (2013b). "Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that downregulates its expression in vitro and in vivo." *J Neurosci* **33**(35): 14269-14281.
- de Juan-Sanz, J., E. Nunez, F. Zafra, M. Berrocal, I. Corbacho, I. Ibanez, E. Arribas-Gonzalez, D. Marcos, B. Lopez-Corcuera, A. M. Mata and C. Aragon (2014). "Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX)." *J Biol Chem* **289**(49): 34308-34324.
- de Juan-Sanz, J., F. Zafra, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2011). "Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination." *Traffic* **12**(12): 1850-1867.
- De Roo, M., E. Boue-Grabot and R. Schlichter (2010). "Selective potentiation of homomeric P2X2 ionotropic ATP receptors by a fast non-genomic action of progesterone." *Neuropharmacology* **58**(3): 569-577.
- De Roo, M., J. L. Rodeau and R. Schlichter (2003). "Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones." *J Physiol* **552**(Pt 1): 59-71.

- Di Stasi, A. M., C. Mallozzi, G. Macchia, G. Maura, T. C. Petrucci and M. Minetti (2002). "Peroxynitrite affects exocytosis and SNARE complex formation and induces tyrosine nitration of synaptic proteins." *J Neurochem* **82**(2): 420-429.
- Diaz-Hernandez, M., J. Pintor, E. Castro and M. T. Miras-Portugal (2002). "Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals." *Neuropharmacology* **42**(1): 20-33.
- Dickenson, A. H., V. Chapman and G. M. Green (1997). "The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord." *Gen Pharmacol* **28**(5): 633-638.
- Dohi, T., K. Morita, T. Kitayama, N. Motoyama and N. Morioka (2009). "Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain." *Pharmacol Ther* **123**(1): 54-79.
- Donnelly-Roberts, D. L. and M. F. Jarvis (2007). "Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states." *Br J Pharmacol* **151**(5): 571-579.
- Dorn, G., S. Patel, G. Wotherspoon, M. Hemmings-Mieszczyk, J. Barclay, F. J. Natt, P. Martin, S. Bevan, A. Fox, P. Ganju, W. Wishart and J. Hall (2004). "siRNA relieves chronic neuropathic pain." *Nucleic Acids Res* **32**(5): e49.
- Dutertre, S., C. M. Becker and H. Betz (2012). "Inhibitory glycine receptors: an update." *J Biol Chem* **287**(48): 40216-40223.
- Duttaroy, A., J. Gomez, J. W. Gan, N. Siddiqui, A. S. Basile, W. D. Harman, P. L. Smith, C. C. Felder, A. I. Levey and J. Wess (2002). "Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." *Mol Pharmacol* **62**(5): 1084-1093.
- Eccles, J. C., R. M. Eccles and F. Magni (1961). "Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys." *J Physiol* **159**: 147-166.
- Edington, A. R., A. A. McKinzie, A. J. Reynolds, M. Kassiou, R. M. Ryan and R. J. Vandenberg (2009). "Extracellular loops 2 and 4 of GLYT2 are required for N-arachidonylglycine inhibition of glycine transport." *J Biol Chem* **284**(52): 36424-36430.
- Edwards, F. A., A. J. Gibb and D. Colquhoun (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system." *Nature* **359**(6391): 144-147.
- Eijkelkamp, N., H. Wang, A. Garza-Carbajal, H. L. Willems, F. J. Zwartkruis, J. N. Wood, R. Dantzer, K. W. Kelley, C. J. Heijnen and A. Kavelaars (2010). "Low nociceptor GRK2 prolongs prostaglandin E2 hyperalgesia via biased cAMP signaling to Epac/Rap1, protein kinase Cepsilon, and MEK/ERK." *J Neurosci* **30**(38): 12806-12815.
- Esplagues, J. V. (2002). "NO as a signalling molecule in the nervous system." *Br J Pharmacol* **135**(5): 1079-1095.
- Evans, R. J., C. Lewis, G. Buell, S. Valera, R. A. North and A. Surprenant (1995). "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." *Mol Pharmacol* **48**(2): 178-183.
- Farquhar-Smith, W. P., M. Egertova, E. J. Bradbury, S. B. McMahon, A. S. Rice and M. R. Elphick (2000). "Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord." *Mol Cell Neurosci* **15**(6): 510-521.
- Felder, C. C. (1995). "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors." *FASEB J* **9**(8): 619-625.
- Ferguson, D. R., I. Kennedy and T. J. Burton (1997). "ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?" *J Physiol* **505** ( Pt 2): 503-511.
- Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther and F. Di Virgilio (2006). "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." *J Immunol* **176**(7): 3877-3883.
- Ferrini, F. and Y. De Koninck (2013). "Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling." *Neural Plast* **2013**: 429815.
- Florenzano, F., M. T. Viscomi, S. Amadio, N. D'Ambrosi, C. Volonte and M. Molinari (2008). "Do ATP and NO interact in the CNS?" *Prog Neurobiol* **84**(1): 40-56.
- Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hosli, K. Haenraets, A. Ghanem, K. K. Conzelmann, M. Bosl and H. U. Zeilhofer (2015). "Targeted

- ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch." *Neuron* **85**(6): 1289-1304.
- Francis, S. H., J. L. Busch, J. D. Corbin and D. Sibley (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." *Pharmacol Rev* **62**(3): 525-563.
- Friess, E., T. Schiffelholz, T. Steckler and A. Steiger (2000). "Dehydroepiandrosterone--a neurosteroid." *Eur J Clin Invest* **30 Suppl 3**: 46-50.
- Fukuhara, N., Y. Imai, A. Sakakibara, K. Morita, S. Kitayama, K. Tanne and T. Dohi (2000). "Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice." *Neurosci Lett* **292**(1): 25-28.
- Fukuoka, T., K. Kobayashi, H. Yamanaka, K. Obata, Y. Dai and K. Noguchi (2008). "Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons." *J Comp Neurol* **510**(2): 188-206.
- Fukuoka, T. and K. Noguchi (2011). "Comparative study of voltage-gated sodium channel alpha-subunits in non-overlapping four neuronal populations in the rat dorsal root ganglion." *Neurosci Res* **70**(2): 164-171.
- Fundytus, M. E. (2001). "Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain." *CNS Drugs* **15**(1): 29-58.
- Garcia-Guzman, M., W. Stuhmer and F. Soto (1997). "Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor." *Brain Res Mol Brain Res* **47**(1-2): 59-66.
- Gasnier, B. (2004). "The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids." *Pflugers Arch* **447**(5): 756-759.
- Geerlings, A., B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2000). "Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNARE protein syntaxin 1A." *FEBS Lett* **470**(1): 51-54.
- Geerlings, A., E. Nunez, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2001). "Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2." *J Biol Chem* **276**(20): 17584-17590.
- Gerevich, Z. and P. Illes (2004). "P2Y receptors and pain transmission." *Purinergic Signal* **1**(1): 3-10.
- Gerevich, Z., C. Muller and P. Illes (2005). "Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons." *Eur J Pharmacol* **521**(1-3): 34-38.
- Gerevich, Z., Z. Zadori, C. Muller, K. Wirkner, W. Schroder, P. Rubini and P. Illes (2007). "Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization." *Br J Pharmacol* **151**(2): 226-236.
- Gever, J. R., R. Soto, R. A. Henningsen, R. S. Martin, D. H. Hackos, S. Panicker, W. Rubas, I. B. Oglesby, M. P. Dillon, M. E. Milla, G. Burnstock and A. P. Ford (2010). "AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist." *Br J Pharmacol* **160**(6): 1387-1398.
- Gimenez, C., G. Perez-Siles, J. Martinez-Villarreal, E. Arribas-Gonzalez, E. Jimenez, E. Nunez, J. de Juan-Sanz, E. Fernandez-Sanchez, N. Garcia-Tardon, I. Ibanez, V. Romanelli, J. Nevado, V. M. James, M. Topf, S. K. Chung, R. H. Thomas, L. R. Desviat, C. Aragon, F. Zafra, M. I. Rees, P. Lapunzina, R. J. Harvey and B. Lopez-Corcuera (2012). "A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2." *J Biol Chem* **287**(34): 28986-29002.
- Gnanasekaran, A., T. Bele, S. Hullugundi, M. Simonetti, M. D. Ferrari, A. M. van den Maagdenberg, A. Nistri and E. Fabbretti (2013b). "Mutated CaV2.1 channels dysregulate CASK/P2X3 signaling in mouse trigeminal sensory neurons of R192Q Cacna1a knock-in mice." *Mol Pain* **9**: 62.
- Gnanasekaran, A., M. Sundukova, S. Hullugundi, N. Birsa, G. Bianchini, Y. P. Hsueh, A. Nistri and E. Fabbretti (2013a). "Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) is a new intracellular modulator of P2X3 receptors." *J Neurochem* **126**(1): 102-112.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Gualix and M. T. Miras-Portugal (2001). "Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion." *J Neurochem* **77**(1): 84-93.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Pintor, J. Gualix and M. T. Miras-Portugal (2003). "GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes." *Neuropharmacology* **44**(3): 311-323.

- Gomez-Villafuertes, R., J. Pintor, J. Gualix and M. T. Miras-Portugal (2004). "GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals." *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3): 1148-1157.
- Gomez, J., S. Hulsmann, K. Ohno, V. Eulenburg, K. Szoke, D. Richter and H. Betz (2003a). "Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition." *Neuron* **40**(4): 785-796.
- Gomez, J., K. Ohno, S. Hulsmann, W. Armsen, V. Eulenburg, D. W. Richter, B. Laube and H. Betz (2003b). "Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality." *Neuron* **40**(4): 797-806.
- Grammatopoulos, D. K. (2017). "Regulation of G-protein coupled receptor signalling underpinning neurobiology of mood disorders and depression." *Mol Cell Endocrinol*.
- Gualix, J., R. Gomez-Villafuertes, M. Diaz-Hernandez and M. T. Miras-Portugal (2003). "Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain." *J Neurochem* **87**(1): 160-171.
- Guan, Y., M. Yaster, S. N. Raja and Y. X. Tao (2007). "Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice." *Mol Pain* **3**: 29.
- Guo, C., M. Masin, O. S. Qureshi and R. D. Murrell-Lagnado (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." *Mol Pharmacol* **72**(6): 1447-1456.
- Haley, J. E., A. H. Dickenson and M. Schachter (1992). "Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat." *Neuropharmacology* **31**(3): 251-258.
- Han, Y., J. Zhang and M. M. Slaughter (1997). "Partition of transient and sustained inhibitory glycinergic input to retinal ganglion cells." *J Neurosci* **17**(10): 3392-3400.
- Hansen, M. A., M. R. Bennett and J. A. Barden (1999). "Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart." *J Auton Nerv Syst* **78**(1): 1-9.
- Haranishi, Y., K. Hara, T. Terada, S. Nakamura and T. Sata (2010). "The antinociceptive effect of intrathecal administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in a rat acute pain model." *Anesth Analg* **110**(2): 615-621.
- Harvey, R. J., E. Carta, B. R. Pearce, S. K. Chung, S. Supplisson, M. I. Rees and K. Harvey (2008). "A critical role for glycine transporters in hyperexcitability disorders." *Front Mol Neurosci* **1**: 1.
- Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassle, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfner, H. Betz, H. U. Zeilhofer and U. Muller (2004). "GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization." *Science* **304**(5672): 884-887.
- Harvey, R. J. and B. K. Yee (2013). "Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain." *Nat Rev Drug Discov* **12**(11): 866-885.
- Hecker, M., A. Mulsch and R. Busse (1994). "Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase." *J Neurochem* **62**(4): 1524-1529.
- Heinrich, A., A. Kittel, C. Csolle, E. Sylvester Vizi and B. Sperlagh (2008). "Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord." *Neuropharmacology* **54**(2): 375-386.
- Helms, N., M. Kowalski, P. Illes and T. Riedel (2013). "Agonist antagonist interactions at the rapidly desensitizing P2X3 receptor." *PLoS One* **8**(11): e79213.
- Herdegen, S., G. Holmes, A. Cyriac, I. E. Calin-Jageman and R. J. Calin-Jageman (2014). "Characterization of the rapid transcriptional response to long-term sensitization training in *Aplysia californica*." *Neurobiol Learn Mem* **116**: 27-35.
- Hermanns, H., U. Muth-Selbach, P. Lipfert, S. Braun, R. Werdehausen and I. Bauer (2009). "Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons." *Neuroscience* **159**(3): 1148-1153.
- Hoglund, A. U. and H. A. Baghdoyan (1997). "M2, M3 and M4, but not M1, muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord." *J Pharmacol Exp Ther* **281**(1): 470-477.
- Honore, P., D. Donnelly-Roberts, M. T. Namovic, G. Hsieh, C. Z. Zhu, J. P. Mikusa, G. Hernandez, C. Zhong, D. M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A. P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J. P. Sullivan, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2006). "A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)

- methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* **319**(3): 1376-1385.
- Honore, P., K. Kage, J. Mikusa, A. T. Watt, J. F. Johnston, J. R. Wyatt, C. R. Faltynek, M. F. Jarvis and K. Lynch (2002). "Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats." *Pain* **99**(1-2): 11-19.
- Horiuchi, M., S. Loeblich, J. H. Brandstaetter, M. Kneussel and H. Betz (2005). "Cellular localization and subcellular distribution of Unc-33-like protein 6, a brain-specific protein of the collapsin response mediator protein family that interacts with the neuronal glycine transporter 2." *J Neurochem* **94**(2): 307-315.
- Hossaini, M., P. J. French and J. C. Holstege (2007). "Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord." *Brain Res* **1142**: 61-69.
- Housley, G. D., D. J. Jagger, D. Greenwood, N. P. Raybould, S. G. Salih, L. E. Jarlebark, S. M. Vlajkovic, R. Kanjhan, P. Nikolic, D. J. Munoz and P. R. Thorne (2002). "Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission." *Audiol Neurootol* **7**(1): 55-61.
- Huang, S. M., T. Bisogno, T. J. Petros, S. Y. Chang, P. A. Zavitsanos, R. E. Zipkin, R. Sivakumar, A. Coop, D. Y. Maeda, L. De Petrocellis, S. Burstein, V. Di Marzo and J. M. Walker (2001). "Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain." *J Biol Chem* **276**(46): 42639-42644.
- Hugel, S. and R. Schlichter (2000). "Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons." *J Neurosci* **20**(6): 2121-2130.
- Hughes, D. I., S. Sikander, C. M. Kinnon, K. A. Boyle, M. Watanabe, R. J. Callister and B. A. Graham (2012). "Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn." *J Physiol* **590**(16): 3927-3951.
- Inoue, K., M. Tsuda and S. Koizumi (2004). "ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4." *J Pharmacol Sci* **94**(2): 112-114.
- Iwamoto, E. T. and L. Marion (1994). "Pharmacologic evidence that spinal muscarinic analgesia is mediated by an L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP cascade in rats." *J Pharmacol Exp Ther* **271**(2): 601-608.
- Jaafari, N., J. M. Henley and J. G. Hanley (2012). "PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking." *J Neurosci* **32**(34): 11618-11630.
- Jacobson, K. A., S. Costanzi, B. V. Joshi, P. Besada, D. H. Shin, H. Ko, A. A. Ivanov and L. Mamedova (2006). "Agonists and antagonists for P2 receptors." *Novartis Found Symp* **276**: 58-68; discussion 68-72, 107-112, 275-181.
- Jacus, M. O., V. N. Uebele, J. J. Renger and S. M. Todorovic (2012). "Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons." *J Neurosci* **32**(27): 9374-9382.
- Jahr, C. E. and T. M. Jessell (1983). "ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones." *Nature* **304**(5928): 730-733.
- Jardetzky, O. (1966). "Simple allosteric model for membrane pumps." *Nature* **211**(5052): 969-970.
- Jarvis, M. F., E. C. Burgard, S. McGaraughty, P. Honore, K. Lynch, T. J. Brennan, A. Subieta, T. Van Biesen, J. Cartmell, B. Bianchi, W. Niforatos, K. Kage, H. Yu, J. Mikusa, C. T. Wismer, C. Z. Zhu, K. Chu, C. H. Lee, A. O. Stewart, J. Polakowski, B. F. Cox, E. Kowaluk, M. Williams, J. Sullivan and C. Faltynek (2002). "A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 17179-17184.
- Javitt, D. C. (2015). "Current and emergent treatments for symptoms and neurocognitive impairment in schizophrenia." *Curr Treat Options Psychiatry* **1**(2): 107-120.
- Jeong, H. J., R. J. Vandenberg and C. W. Vaughan (2010). "N-arachidonyl-glycine modulates synaptic transmission in superficial dorsal horn." *Br J Pharmacol* **161**(4): 925-935.
- Jiang, L. H., M. Kim, V. Spelta, X. Bo, A. Surprenant and R. A. North (2003). "Subunit arrangement in P2X receptors." *J Neurosci* **23**(26): 8903-8910.

- Jiang, L. H., A. B. Mackenzie, R. A. North and A. Surprenant (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." *Mol Pharmacol* **58**(1): 82-88.
- Jimenez, E., F. Zafra, R. Perez-Sen, E. G. Delicado, M. T. Miras-Portugal, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2011). "P2Y purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters." *J Biol Chem* **286**(12): 10712-10724.
- Jo, Y. H. and L. W. Role (2002). "Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses." *J Neurophysiol* **88**(5): 2501-2508.
- Jo, Y. H. and R. Schlichter (1999). "Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons." *Nat Neurosci* **2**(3): 241-245.
- Joseph, S. M., M. A. Pifer, R. J. Przybylski and G. R. Dubyak (2004). "Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation." *Br J Pharmacol* **142**(6): 1002-1014.
- Ju, P., K. R. Aubrey and R. J. Vandenberg (2004). "Zn<sup>2+</sup> inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b." *J Biol Chem* **279**(22): 22983-22991.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* **413**(6852): 203-210.
- Jursky, F. and N. Nelson (1995). "Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor." *J Neurochem* **64**(3): 1026-1033.
- Kasten, C. R. and S. L. Boehm, 2nd (2015). "Identifying the role of pre-and postsynaptic GABA(B) receptors in behavior." *Neurosci Biobehav Rev* **57**: 70-87.
- Keilhoff, G., H. Fansa and G. Wolf (2002). "Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy." *J Chem Neuroanat* **24**(3): 181-187.
- Khakh, B. S., G. Burnstock, C. Kennedy, B. F. King, R. A. North, P. Seguela, M. Voigt and P. P. Humphrey (2001). "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." *Pharmacol Rev* **53**(1): 107-118.
- Khakh, B. S., D. Gittermann, D. A. Cockayne and A. Jones (2003). "ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons." *J Neurosci* **23**(19): 7426-7437.
- Khawaled, R., A. Bruening-Wright, J. P. Adelman and J. Maylie (1999). "Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels." *Pflugers Arch* **438**(3): 314-321.
- Khelashvili, G. and H. Weinstein (2015). "Functional mechanisms of neurotransmitter transporters regulated by lipid-protein interactions of their terminal loops." *Biochim Biophys Acta* **1848**(9): 1765-1774.
- King, B. F., S. S. Wildman, L. E. Ziganshina, J. Pintor and G. Burnstock (1997). "Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor." *Br J Pharmacol* **121**(7): 1445-1453.
- Kittner, H., H. Franke, W. Fischer, N. Schultheis, U. Krugel and P. Illes (2003). "Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production." *Neuropsychopharmacology* **28**(3): 435-444.
- Kobayashi, K., T. Fukuoka, H. Yamanaka, Y. Dai, K. Obata, A. Tokunaga and K. Noguchi (2005). "Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat." *J Comp Neurol* **481**(4): 377-390.
- Kobayashi, K., H. Yamanaka, T. Fukuoka, Y. Dai, K. Obata and K. Noguchi (2008). "P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain." *J Neurosci* **28**(11): 2892-2902.
- Krishtal, O. A., S. M. Marchenko and V. I. Pidoplichko (1983). "Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones." *Neurosci Lett* **35**(1): 41-45.
- Kristensen, A. S., J. Andersen, T. N. Jorgensen, L. Sorensen, J. Eriksen, C. J. Loland, K. Stromgaard and U. Gether (2011). "SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation." *Pharmacol Rev* **63**(3): 585-640.
- Kumar, N., P. S. Cherkas, C. Y. Chiang, J. O. Dostrovsky, B. J. Sessle and T. J. Coderre (2012). "Involvement of ATP in noxious stimulus-evoked release of glutamate in rat medullary dorsal horn: a microdialysis study." *Neurochem Int* **61**(8): 1276-1279.

- Kurolap, A., A. Armbruster, T. Hershkovitz, K. Hauf, A. Mory, T. Paperna, E. Hannappel, G. Tal, Y. Nijem, E. Sella, M. Mahajnah, A. Ilivitzki, D. Hershkovitz, N. Ekhilevitch, H. Mandel, V. Eulenburg and H. N. Baris (2016). "Loss of Glycine Transporter 1 Causes a Subtype of Glycine Encephalopathy with Arthrogryposis and Mildly Elevated Cerebrospinal Fluid Glycine." Am J Hum Genet **99**(5): 1172-1180.
- Lalo, U., Y. Pankratov, S. P. Wichert, M. J. Rossner, R. A. North, F. Kirchhoff and A. Verkhratsky (2008). "P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes." J Neurosci **28**(21): 5473-5480.
- Lavender, V., S. Chong, K. Ralphs, A. J. Wolstenholme and B. J. Reaves (2008). "Increasing the expression of calcium-permeable TRPC3 and TRPC7 channels enhances constitutive secretion." Biochem J **413**(3): 437-446.
- Lee, S. (2013). "Pharmacological Inhibition of Voltage-gated Ca(2+) Channels for Chronic Pain Relief." Curr Neuropharmacol **11**(6): 606-620.
- Legendre, P. (2001). "The glycinergic inhibitory synapse." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 760-793.
- Legler, D. F., M. Bruckner, E. Uetz-von Allmen and P. Krause (2010). "Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances." Int J Biochem Cell Biol **42**(2): 198-201.
- Leon-Bollotte, L., S. Subramaniam, O. Cauvard, S. Plenchette-Colas, C. Paul, C. Godard, A. Martinez-Ruiz, P. Legembre, J. F. Jeannin and A. Bettaieb (2011). "S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells." Gastroenterology **140**(7): 2009-2018, 2018 e2001-2004.
- Lewis, C., S. Neidhart, C. Holy, R. A. North, G. Buell and A. Surprenant (1995). "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature **377**(6548): 432-435.
- Li, H. and T. L. Poulos (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." J Inorg Biochem **99**(1): 293-305.
- Licinio, J., P. Prolo, S. M. McCann and M. L. Wong (1999). "Brain iNOS: current understanding and clinical implications." Mol Med Today **5**(5): 225-232.
- Liu, G. J., J. Brockhausen and M. R. Bennett (2003). "P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells." Auton Neurosci **108**(1-2): 12-16.
- Liu, P. S., H. L. Hsieh and C. M. Lin (2001). "Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) suppresses P2X purinoceptor-coupled responses in PC12 cells." Neurochem Int **39**(3): 193-198.
- Lopez-Corcuera, B., E. Nunez, R. Martinez-Maza, A. Geerlings and C. Aragon (2001). "Substrate-induced conformational changes of extracellular loop 1 in the glycine transporter GLYT2." J Biol Chem **276**(46): 43463-43470.
- Lu, W., H. Man, W. Ju, W. S. Trimble, J. F. MacDonald and Y. T. Wang (2001). "Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons." Neuron **29**(1): 243-254.
- Luo, Z. D. and D. Cizkova (2000). "The role of nitric oxide in nociception." Curr Rev Pain **4**(6): 459-466.
- Luo, Z. D., S. R. Chaplan, B. P. Scott, D. Cizkova, N. A. Calcutt and T. L. Yaksh (1999). "Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development." J Neurosci **19**(21): 9201-9208.
- Lynch, K. J., E. Touma, W. Niforatos, K. L. Kage, E. C. Burgard, T. van Biesen, E. A. Kowaluk and M. F. Jarvis (1999). "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." Mol Pharmacol **56**(6): 1171-1181.
- Llewellyn-Smith, I. J. and G. Burnstock (1998). "Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons." Neuroreport **9**(11): 2545-2550.
- Ma, H. C., S. Dohi, Y. F. Wang, Y. Ishizawa and F. Yanagidate (2001). "The antinociceptive and sedative effects of carbachol and oxycodone administered into brainstem pontine reticular formation and spinal subarachnoid space in rats." Anesth Analg **92**(5): 1307-1315.
- Macintyre, E. H., J. Ponten and A. E. Vatter (1972). "The ultrastructure of human and murine astrocytes and of human fibroblasts in culture." Acta Pathol Microbiol Scand A **80**(2): 267-283.
- Madden, D. R. (2002). "The structure and function of glutamate receptor ion channels." Nat Rev Neurosci **3**(2): 91-101.



- Maggio, R., G. Innamorati and M. Parenti (2007). "G protein-coupled receptor oligomerization provides the framework for signal discrimination." *J Neurochem* **103**(5): 1741-1752.
- Maihofner, C., C. Euchenhofer, I. Tegeder, K. F. Beck, J. Pfeilschifter and G. Geisslinger (2000). "Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation." *Neurosci Lett* **290**(1): 71-75.
- Martinez-Maza, R., I. Poyatos, B. Lopez-Corcuera, N. u. E, C. Gimenez, F. Zafra and C. Aragon (2001). "The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2." *J Biol Chem* **276**(3): 2168-2173.
- Martucci, C., A. E. Trovato, B. Costa, E. Borsani, S. Franchi, V. Magnaghi, A. E. Panerai, L. F. Rodella, A. E. Valsecchi, P. Sacerdote and M. Colleoni (2008). "The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice." *Pain* **137**(1): 81-95.
- McCarson, K. E., A. Ralya, S. A. Reisman and S. J. Enna (2005). "Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABA(B) receptor expression and function in an animal model of neuropathic pain." *Biochem Pharmacol* **71**(1-2): 196-202.
- McGaraghty, S., K. L. Chu, M. T. Namovic, D. L. Donnelly-Roberts, R. R. Harris, X. F. Zhang, C. C. Shieh, C. T. Wismer, C. Z. Zhu, D. M. Gauvin, A. C. Fabiyi, P. Honore, R. J. Gregg, M. E. Kort, D. W. Nelson, W. A. Carroll, K. Marsh, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2007). "P2X7-related modulation of pathological nociception in rats." *Neuroscience* **146**(4): 1817-1828.
- McLarnon, J. G., L. Zhang, V. Goghari, Y. B. Lee, W. Walz, C. Krieger and S. U. Kim (1999). "Effects of ATP and elevated K<sup>+</sup> on K<sup>+</sup> currents and intracellular Ca<sup>2+</sup> in human microglia." *Neuroscience* **91**(1): 343-352.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." *Science* **150**(3699): 971-979.
- Mendoza-Fernandez, V., R. D. Andrew and C. Barajas-Lopez (2000). "ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices." *J Pharmacol Exp Ther* **293**(1): 172-179.
- Meriney, S. D., J. A. Umbach and C. B. Gundersen (2014). "Fast, Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis at nerve terminals: shortcomings of SNARE-based models." *Prog Neurobiol* **121**: 55-90.
- Miclescu, A. and T. Gordh (2009). "Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'." *Acta Anaesthesiol Scand* **53**(9): 1107-1120.
- Milatovic, D., T. J. Montine and M. Aschner (2011). "Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity." *Neurotoxicology* **32**(3): 312-319.
- Miranda, M., C. C. Wu, T. Sorkina, D. R. Korstjens and A. Sorkin (2005). "Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C." *J Biol Chem* **280**(42): 35617-35624.
- Mo, G., L. P. Bernier, Q. Zhao, A. J. Chabot-Dore, A. R. Ase, D. Logothetis, C. Q. Cao and P. Seguela (2009). "Subtype-specific regulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors." *Mol Pain* **5**: 47.
- Moore, K. A., T. Kohno, L. A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba and C. J. Woolf (2002). "Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord." *J Neurosci* **22**(15): 6724-6731.
- Mori, M., C. Heuss, B. H. Gähwiler and U. Gerber (2001). "Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures." *J Physiol* **535**(Pt 1): 115-123.
- Morita, K., N. Motoyama, T. Kitayama, N. Morioka, K. Kifune and T. Dohi (2008). "Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **326**(2): 633-645.
- Morton-Jones, R. T., S. M. Vlajkovic, P. R. Thorne, D. A. Cockayne, A. F. Ryan and G. D. Housley (2015). "Properties of ATP-gated ion channels assembled from P2X2 subunits in mouse cochlear Reissner's membrane epithelial cells." *Purinergic Signal* **11**(4): 551-560.
- Moss, S. J. and T. G. Smart (2001). "Constructing inhibitory synapses." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 240-250.
- Mulryan, K., D. P. Gitterman, C. J. Lewis, C. Vial, B. J. Leckie, A. L. Cobb, J. E. Brown, E. C. Conley, G. Buell, C. A. Pritchard and R. J. Evans (2000). "Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors." *Nature* **403**(6765): 86-89.

- Munoz, D. J., P. R. Thorne and G. D. Housley (1999). "P2X receptor-mediated changes in cochlear potentials arising from exogenous adenosine 5'-triphosphate in endolymph." *Hear Res* **138**(1-2): 56-64.
- Murrell-Lagnado, R. D. and O. S. Qureshi (2008). "Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)." *Mol Membr Biol* **25**(4): 321-331.
- Nair, A., M. Simonetti, E. Fabbretti and A. Nistri (2010). "The Cdk5 kinase downregulates ATP-gated ionotropic P2X3 receptor function via serine phosphorylation." *Cell Mol Neurobiol* **30**(4): 505-509.
- Naito, Y. and K. Ui-Tei (2012). "siRNA Design Software for a Target Gene-Specific RNA Interference." *Front Genet* **3**: 102.
- Nakazawa, K. (1994). "ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons." *J Neurosci* **14**(2): 740-750.
- Nicke, A., H. G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler and G. Schmalzing (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *EMBO J* **17**(11): 3016-3028.
- Nishikawa, Y., A. Sasaki and Y. Kuraishi (2010). "Blockade of glycine transporter (GlyT) 2, but not GlyT1, ameliorates dynamic and static mechanical allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain." *J Pharmacol Sci* **112**(3): 352-360.
- Noguchi, K., Y. Kawai, T. Fukuoka, E. Senba and K. Miki (1995). "Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons." *J Neurosci* **15**(11): 7633-7643.
- Noma, N., M. Shinoda, K. Honda, M. Kiyomoto, K. Dezawa, Y. Nakaya, O. Komiyama, Y. Imamura and K. Iwata (2013). "Interaction of IL-1beta and P2X(3) receptor in pathologic masseter muscle pain." *J Dent Res* **92**(5): 456-460.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-1067.
- Novakovic, S. D., L. C. Kassotakis, I. B. Oglesby, J. A. Smith, R. M. Eglon, A. P. Ford and J. C. Hunter (1999). "Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury." *Pain* **80**(1-2): 273-282.
- Nunez, E., P. Alonso-Torres, A. Fornes, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2008). "The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment." *J Neurochem* **105**(6): 2080-2090.
- Nunez, E., B. Lopez-Corcuera, R. Martinez-Maza and C. Aragon (2000). "Differential effects of ethanol on glycine uptake mediated by the recombinant GLYT1 and GLYT2 glycine transporters." *Br J Pharmacol* **129**(4): 802-810.
- Nunez, E., G. Perez-Siles, L. Rodenstein, P. Alonso-Torres, F. Zafra, E. Jimenez, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2009). "Subcellular localization of the neuronal glycine transporter GLYT2 in brainstem." *Traffic* **10**(7): 829-843.
- Ohno, K., M. Koroll, O. El Far, P. Scholze, J. Gomeza and H. Betz (2004). "The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1." *Mol Cell Neurosci* **26**(4): 518-529.
- Okada, M., T. Nakagawa, M. Minami and M. Satoh (2002). "Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats." *J Pharmacol Exp Ther* **303**(1): 66-73.
- Olivares, L., C. Aragon, C. Gimenez and F. Zafra (1995). "The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter." *J Biol Chem* **270**(16): 9437-9442.
- Omori, Y., M. Nakajima, K. Nishimura, E. Takahashi, T. Arai, M. Akahira, T. Suzuki and M. Kainoh (2015). "Analgesic effect of GT-0198, a structurally novel glycine transporter 2 inhibitor, in a mouse model of neuropathic pain." *J Pharmacol Sci* **127**(3): 377-381.
- Palmer, Z. J., R. R. Duncan, J. R. Johnson, L. Y. Lian, L. V. Mello, D. Booth, J. W. Barclay, M. E. Graham, R. D. Burgoyne, I. A. Prior and A. Morgan (2008). "S-nitrosylation of syntaxin 1 at Cys(145) is a regulatory switch controlling Munc18-1 binding." *Biochem J* **413**(3): 479-491.
- Pang, M. H., Y. Kim, K. W. Jung, S. Cho and D. H. Lee (2012). "A series of case studies: practical methodology for identifying antinociceptive multi-target drugs." *Drug Discov Today* **17**(9-10): 425-434.

- Pankratov, Y., E. Castro, M. T. Miras-Portugal and O. Krishtal (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**(12): 3898-3902.
- Paoloni, J. A., R. C. Appleyard, J. Nelson and G. A. Murrell (2003). "Topical nitric oxide application in the treatment of chronic extensor tendinosis at the elbow: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial." *Am J Sports Med* **31**(6): 915-920.
- Papp, L., E. S. Vizi and B. Sperlagh (2004). "Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice." *Neuroreport* **15**(15): 2387-2391.
- Park, C. K., J. H. Bae, H. Y. Kim, H. J. Jo, Y. H. Kim, S. J. Jung, J. S. Kim and S. B. Oh (2010). "Substance P sensitizes P2X3 in nociceptive trigeminal neurons." *J Dent Res* **89**(10): 1154-1159.
- Park, S. U., J. V. Ferrer, J. A. Javitch and D. M. Kuhn (2002). "Peroxyntirite inactivates the human dopamine transporter by modification of cysteine 342: potential mechanism of neurotoxicity in dopamine neurons." *J Neurosci* **22**(11): 4399-4405.
- Parr, C. E., D. M. Sullivan, A. M. Paradiso, E. R. Lazarowski, L. H. Burch, J. C. Olsen, L. Erb, G. A. Weisman, R. C. Boucher and J. T. Turner (1994). "Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3275-3279.
- Paukert, M., R. Osteroth, H. S. Geisler, U. Brandle, E. Glowatzki, J. P. Ruppertsberg and S. Grunder (2001). "Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit." *J Biol Chem* **276**(24): 21077-21082.
- Pehl, U. and H. A. Schmid (1997). "Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide." *Neuroscience* **77**(2): 563-573.
- Penmatsa, A., K. H. Wang and E. Gouaux (2013). "X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism." *Nature* **503**(7474): 85-90.
- Perez-Siles, G., A. Morreale, A. Leo-Macias, G. Pita, A. R. Ortiz, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2011). "Molecular basis of the differential interaction with lithium of glycine transporters GLYT1 and GLYT2." *J Neurochem* **118**(2): 195-204.
- Perez-Siles, G., E. Nunez, A. Morreale, E. Jimenez, A. Leo-Macias, G. Pita, F. Cherubino, R. Sangaletti, E. Bossi, A. R. Ortiz, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2012). "An aspartate residue in the external vestibule of GLYT2 (glycine transporter 2) controls cation access and transport coupling." *Biochem J* **442**(2): 323-334.
- Petruska, J. C., W. J. Streit and R. D. Johnson (1997). "Localization of unmyelinated axons in rat skin and mucocutaneous tissue utilizing the isolectin GS-I-B4." *Somatosens Mot Res* **14**(1): 17-26.
- Plenderleith, M. B. and P. J. Snow (1993). "The plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurones which innervate the skin in the rat." *Neurosci Lett* **159**(1-2): 17-20.
- Pollatzek, E., N. Hitzel, D. Ott, K. Raisl, B. Reuter and R. Gerstberger (2016). "Functional expression of P2 purinoceptors in a primary neuroglial cell culture of the rat arcuate nucleus." *Neuroscience* **327**: 95-114.
- Pratt, E. B., T. S. Brink, P. Bergson, M. M. Voigt and S. P. Cook (2005). "Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist." *J Neurosci* **25**(32): 7359-7365.
- Protti, D. A., H. M. Gerschenfeld and I. Llano (1997). "GABAergic and glycinergic IPSCs in ganglion cells of rat retinal slices." *J Neurosci* **17**(16): 6075-6085.
- Pryazhnikov, E., D. Fayuk, M. Niittykoski, R. Giniatullin and L. Khiroug (2011). "Unusually Strong Temperature Dependence of P2X3 Receptor Traffic to the Plasma Membrane." *Front Cell Neurosci* **5**: 27.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* **50**(3): 413-492.
- Reinold, H., S. Ahmadi, U. B. Depner, B. Layh, C. Heindl, M. Hamza, A. Pahl, K. Brune, S. Narumiya, U. Muller and H. U. Zeilhofer (2005). "Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype." *J Clin Invest* **115**(3): 673-679.
- Ren, J., X. Bian, M. DeVries, B. Schnegelsberg, D. A. Cockayne, A. P. Ford and J. J. Galligan (2003). "P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine." *J Physiol* **552**(Pt 3): 809-821.

- Rettinger, J. and G. Schmalzing (2003). "Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations." *J Gen Physiol* **121**(5): 451-461.
- Richardson, P. J. and S. J. Brown (1987). "ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals." *J Neurochem* **48**(2): 622-630.
- Robson, S. C., J. Sevigny and H. Zimmermann (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." *Purinergic Signal* **2**(2): 409-430.
- Rodrigues, R. J., T. Almeida, P. J. Richardson, C. R. Oliveira and R. A. Cunha (2005). "Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus." *J Neurosci* **25**(27): 6286-6295.
- Rojewska, E., A. Piotrowska, W. Makuch, B. Przewlocka and J. Mika (2016). "Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model." *Neuropharmacology* **102**: 80-91.
- Rolf, M. G., C. A. Brearley and M. P. Mahaut-Smith (2001). "Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP." *Thromb Haemost* **85**(2): 303-308.
- Rong, W., A. V. Gourine, D. A. Cockayne, Z. Xiang, A. P. Ford, K. M. Spyer and G. Burnstock (2003). "Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia." *J Neurosci* **23**(36): 11315-11321.
- Roper, S. D. (2007). "Signal transduction and information processing in mammalian taste buds." *Pflugers Arch* **454**(5): 759-776.
- Rousseau, F., K. R. Aubrey and S. Supplisson (2008). "The glycine transporter GlyT2 controls the dynamics of synaptic vesicle refilling in inhibitory spinal cord neurons." *J Neurosci* **28**(39): 9755-9768.
- Ruan, H. Z. and G. Burnstock (2003). "Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat." *Histochem Cell Biol* **120**(5): 415-426.
- Rubio, M. E. and F. Soto (2001). "Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations." *J Neurosci* **21**(2): 641-653.
- Rudnick, G., R. Kramer, R. D. Blakely, D. L. Murphy and F. Verrey (2014). "The SLC6 transporters: perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction." *Pflugers Arch* **466**(1): 25-42.
- Ruscheweyh, R., L. Forsthuber, D. Schoffnegger and J. Sandkuhler (2007). "Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice." *J Comp Neurol* **502**(2): 325-336.
- Ruscheweyh, R., A. Goralczyk, G. Wunderbaldinger, A. Schober and J. Sandkuhler (2006). "Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons." *Neuroscience* **141**(2): 977-988.
- Ryuman, N., N. Watanabe and T. Arai (2011). "S-nitrosation of cellular proteins by NO donors in rat embryonic fibroblast 3Y1 cells: factors affecting S-nitrosation." *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 450317.
- Salter, M. W., Y. De Koninck and J. L. Henry (1993). "Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn." *Prog Neurobiol* **41**(2): 125-156.
- Salter, M. W. and J. L. Henry (1985). "Effects of adenosine 5'-monophosphate and adenosine 5'-triphosphate on functionally identified units in the cat spinal dorsal horn. Evidence for a differential effect of adenosine 5'-triphosphate on nociceptive vs non-nociceptive units." *Neuroscience* **15**(3): 815-825.
- Sawynok, J., J. W. Downie, A. R. Reid, C. M. Cahill and T. D. White (1993). "ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin." *Brain Res* **610**(1): 32-38.
- Scimemi, A. (2014). "Structure, function, and plasticity of GABA transporters." *Front Cell Neurosci* **8**: 161.
- Schaible, H. G. and F. Richter (2004). "Pathophysiology of pain." *Langenbecks Arch Surg* **389**(4): 237-243.
- Schiavuzzo, J. G., J. M. Teixeira, B. Melo, D. F. da Silva dos Santos, C. O. Jorge, M. C. Oliveira-Fusaro and C. A. Parada (2015). "Muscle hyperalgesia induced by peripheral P2X3 receptors is modulated by inflammatory mediators." *Neuroscience* **285**: 24-33.

- Schmidtko, A., I. Tegeder and G. Geisslinger (2009). "No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing." *Trends Neurosci* **32**(6): 339-346.
- Sen, R. P., E. G. Delicado and M. T. Miras-Portugal (1999). "Differential modulation of nucleoside transport types in neuroblastoma cells by protein kinase activation." *Neuropharmacology* **38**(7): 1009-1015.
- Seo, D. R., S. Y. Kim, K. Y. Kim, H. G. Lee, J. H. Moon, J. S. Lee, S. H. Lee, S. U. Kim and Y. B. Lee (2008). "Cross talk between P2 purinergic receptors modulates extracellular ATP-mediated interleukin-10 production in rat microglial cells." *Exp Mol Med* **40**(1): 19-26.
- Serrano, A., G. Mo, R. Grant, M. Pare, D. O'Donnell, X. H. Yu, M. J. Tomaszewski, M. N. Perkins, P. Seguela and C. Q. Cao (2012). "Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons." *J Neurosci* **32**(34): 11890-11896.
- Sharp, C. J., A. J. Reeve, S. D. Collins, J. C. Martindale, S. G. Summerfield, B. S. Sargent, S. T. Bate and I. P. Chessell (2006). "Investigation into the role of P2X(3)/P2X(2/3) receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study." *Br J Pharmacol* **148**(6): 845-852.
- Sherman, S. E., L. Luo and J. O. Dostrovsky (1997). "Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus." *J Neurophysiol* **78**(2): 628-637.
- Shi, J., J. Johansson, N. S. Woodling, Q. Wang, T. J. Montine and K. Andreasson (2010). "The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity." *J Immunol* **184**(12): 7207-7218.
- Shigetomi, E. and F. Kato (2004). "Action potential-independent release of glutamate by Ca<sup>2+</sup> entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network." *J Neurosci* **24**(12): 3125-3135.
- Sivilotti, L. and C. J. Woolf (1994). "The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord." *J Neurophysiol* **72**(1): 169-179.
- Sokolova, E., A. Nistri and R. Giniatullin (2001). "Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons." *J Neurosci* **21**(14): 4958-4968.
- Sorkin, L. S. and S. Puig (1996). "Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist." *Pain* **68**(2-3): 283-292.
- Souslova, V., P. Cesare, Y. Ding, A. N. Akopian, L. Stanfa, R. Suzuki, K. Carpenter, A. Dickenson, S. Boyce, R. Hill, D. Nebenuis-Oosthuizen, A. J. Smith, E. J. Kidd and J. N. Wood (2000). "Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors." *Nature* **407**(6807): 1015-1017.
- Stemkowski, P. L. and P. A. Smith (2012). "Long-term IL-1beta exposure causes subpopulation-dependent alterations in rat dorsal root ganglion neuron excitability." *J Neurophysiol* **107**(6): 1586-1597.
- Succar, R., V. A. Mitchell and C. W. Vaughan (2007). "Actions of N-arachidonyl-glycine in a rat inflammatory pain model." *Mol Pain* **3**: 24.
- Sugita, R., H. Kuwabara, K. Kubota, K. Sugimoto, T. Kiho, A. Tengeiji, K. Kawakami and K. Shimada (2016). "Simultaneous Inhibition of PGE2 and PGI2 Signals Is Necessary to Suppress Hyperalgesia in Rat Inflammatory Pain Models." *Mediators Inflamm* **2016**: 9847840.
- Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." *Annu Rev Physiol* **71**: 333-359.
- Takahashi, Y., K. Hara, Y. Haranishi, T. Terada, G. Obara and T. Sata (2015). "Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in rat models of inflammatory and neuropathic pain." *Pharmacol Biochem Behav* **130**: 46-52.
- Tamura, S., Y. Morikawa and E. Senba (2005). "TRPV2, a capsaicin receptor homologue, is expressed predominantly in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of primary sensory neurons." *Neuroscience* **130**(1): 223-228.
- Tanabe, M., K. Takasu, S. Yamaguchi, D. Kodama and H. Ono (2008). "Glycine transporter inhibitors as a potential therapeutic strategy for chronic pain with memory impairment." *Anesthesiology* **108**(5): 929-937.

- Tang, Q., C. I. Svensson, B. Fitzsimmons, M. Webb, T. L. Yaksh and X. Y. Hua (2007). "Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation." *Eur J Neurosci* **25**(10): 2964-2972.
- Tao, F., Y. X. Tao, P. Mao, C. Zhao, D. Li, W. J. Liaw, S. N. Raja and R. A. Johns (2003). "Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase." *Neuroscience* **120**(3): 847-854.
- Tarr, T. B., M. Dittrich and S. D. Meriney (2013). "Are unreliable release mechanisms conserved from NMJ to CNS?" *Trends Neurosci* **36**(1): 14-22.
- Taylor, A. M., J. C. Peleshok and A. Ribeiro-da-Silva (2009). "Distribution of P2X(3)-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat." *J Comp Neurol* **514**(6): 555-566.
- Thomas, S., C. Virginio, R. A. North and A. Surprenant (1998). "The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones." *J Physiol* **509** ( Pt 2): 411-417.
- Todd, A. J. (1996). "GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn." *Eur J Neurosci* **8**(12): 2492-2498.
- Todd, A. J. (2010). "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn." *Nat Rev Neurosci* **11**(12): 823-836.
- Torres-Lopez, J. E., C. F. Arguelles and V. Granados-Soto (2002). "Participation of peripheral and spinal phosphodiesterases 4 and 5 in inflammatory pain." *Proc West Pharmacol Soc* **45**: 141-143.
- Torres, G. E., T. M. Egan and M. M. Voigt (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." *J Biol Chem* **274**(10): 6653-6659.
- Toth-Zsomboki, E., C. Oury, H. Watanabe, B. Nilius, J. Vermynen and M. F. Hoylaerts (2002). "The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function." *FEBS Lett* **524**(1-3): 15-19.
- Tozaki-Saitoh, H., M. Tsuda, H. Miyata, K. Ueda, S. Kohsaka and K. Inoue (2008). "P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury." *J Neurosci* **28**(19): 4949-4956.
- Tsai, G., R. J. Ralph-Williams, M. Martina, R. Bergeron, J. Berger-Sweeney, K. S. Dunham, Z. Jiang, S. B. Caine and J. T. Coyle (2004). "Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8485-8490.
- Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter and K. Inoue (2003). "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury." *Nature* **424**(6950): 778-783.
- Ulmann, L., H. Hirbec and F. Rassendren (2010). "P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain." *EMBO J* **29**(14): 2290-2300.
- Valera, S., N. Hussy, R. J. Evans, N. Adami, R. A. North, A. Surprenant and G. Buell (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." *Nature* **371**(6497): 516-519.
- Valtschanoff, J. G., R. J. Weinberg, A. Rustioni and H. H. Schmidt (1992). "Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord." *Neurosci Lett* **148**(1-2): 6-10.
- Vandenberg, R. J., S. N. Mostyn, J. E. Carland and R. M. Ryan (2016). "Glycine transporter2 inhibitors: Getting the balance right." *Neurochem Int* **98**: 89-93.
- Vandenberg, R. J., R. M. Ryan, J. E. Carland, W. L. Imlach and M. J. Christie (2014). "Glycine transport inhibitors for the treatment of pain." *Trends Pharmacol Sci* **35**(8): 423-430.
- Vaughn, M. W., L. Kuo and J. C. Liao (1998). "Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 2): H1705-1714.
- Vial, C. and R. J. Evans (2002a). "P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries." *Mol Pharmacol* **62**(6): 1438-1445.
- Vial, C., J. A. Roberts and R. J. Evans (2004). "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **25**(9): 487-493.
- Vial, C., M. G. Rolf, M. P. Mahaut-Smith and R. J. Evans (2002b). "A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors." *Br J Pharmacol* **135**(2): 363-372.

- Virginio, C., G. Robertson, A. Surprenant and R. A. North (1998). "Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors." Mol Pharmacol **53**(6): 969-973.
- Volonte, C. and N. D'Ambrosi (2009). "Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters." FEBS J **276**(2): 318-329.
- von Kugelgen, I. and K. Starke (1991). "Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **344**(4): 419-429.
- Wang, C., Y. Gu, G. W. Li and L. Y. Huang (2007b). "A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2-induced potentiation of P2X3 receptor currents in inflamed rats." J Physiol **584**(Pt 1): 191-203.
- Wang, C., G. W. Li and L. Y. Huang (2007a). "Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons." Mol Pain **3**: 22.
- Wang, H., M. J. Kohr, C. J. Traynham, D. G. Wheeler, P. M. Janssen and M. T. Ziolo (2008). "Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1566-1575.
- Wang, X. L., H. M. Zhang, D. P. Li, S. R. Chen and H. L. Pan (2006). "Dynamic regulation of glycinergic input to spinal dorsal horn neurones by muscarinic receptor subtypes in rats." J Physiol **571**(Pt 2): 403-413.
- Wang, Y., X. Zhang, Q. L. Guo, W. Y. Zou, C. S. Huang and J. Q. Yan (2010). "Cyclooxygenase inhibitors suppress the expression of P2X(3) receptors in the DRG and attenuate hyperalgesia following chronic constriction injury in rats." Neurosci Lett **478**(2): 77-81.
- Watson, A. H. (2004). "Synaptic interactions between the terminals of slow-adapting type II mechanoreceptor afferents and neurones expressing gamma-aminobutyric acid- and glycine-like immunoreactivity in the rat spinal cord." J Comp Neurol **471**(2): 168-179.
- Watson, A. H., D. I. Hughes and A. A. Bazzaz (2002). "Synaptic relationships between hair follicle afferents and neurones expressing GABA and glycine-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat." J Comp Neurol **452**(4): 367-380.
- Westfall, D. P., K. Shinozuka, K. M. Forsyth and R. A. Bjur (1990). "Presynaptic purine receptors." Ann N Y Acad Sci **604**: 130-135.
- Whitehead, K. J., S. M. Pearce, G. Walker, H. Sundaram, D. Hill and N. G. Bowery (2004). "Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo." Neuroscience **126**(2): 381-390.
- Whitworth, T. L. and M. W. Quick (2001). "Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **276**(46): 42932-42937.
- Wirkner, K., B. Sperlagh and P. Illes (2007). "P2X3 receptor involvement in pain states." Mol Neurobiol **36**(2): 165-183.
- Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999). "Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management." Lancet **353**(9168): 1959-1964.
- Wroblewska, B., I. N. Wegorzewska, T. Bzdega and J. H. Neale (2011). "Type 2 metabotropic glutamate receptor (mGluR2) fails to negatively couple to cGMP in stably transfected cells." Neurochem Int **58**(2): 176-179.
- Wu, J. X., X. M. Yuan, Q. Wang, W. Wei and M. Y. Xu (2016). "Rho/ROCK acts downstream of lysophosphatidic acid receptor 1 in modulating P2X3 receptor-mediated bone cancer pain in rats." Mol Pain **12**.
- Xiao, C., C. Zhou, K. Li, D. L. Davies and J. H. Ye (2008). "Purinergic type 2 receptors at GABAergic synapses on ventral tegmental area dopamine neurons are targets for ethanol action." J Pharmacol Exp Ther **327**(1): 196-205.
- Xu, G. Y. and L. Y. Huang (2004). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11868-11873.
- Yaksh, T. L. (1989). "Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists." Pain **37**(1): 111-123.

- Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin and E. Gouaux (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* **437**(7056): 215-223.
- Yang, K., R. Ma, Q. Wang, P. Jiang and Y. Q. Li (2015). "Optoactivation of parvalbumin neurons in the spinal dorsal horn evokes GABA release that is regulated by presynaptic GABAB receptors." *Neurosci Lett* **594**: 55-59.
- Yang, Z., E. Taran, T. I. Webb and J. W. Lynch (2012). "Stoichiometry and subunit arrangement of alpha1beta glycine receptors as determined by atomic force microscopy." *Biochemistry* **51**(26): 5229-5231.
- Young, M. T., P. Pelegrin and A. Surprenant (2007). "Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP." *Mol Pharmacol* **71**(1): 92-100.
- Yu, D. and W. D. Eldred (2005). "Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina." *J Comp Neurol* **483**(3): 278-291.
- Yuan, Z., B. Liu, L. Yuan, Y. Zhang, X. Dong and J. Lu (2004). "Evidence of nuclear localization of neuronal nitric oxide synthase in cultured astrocytes of rats." *Life Sci* **74**(26): 3199-3209.
- Zafra, F., R. Alcantara, J. Gomeza, C. Aragon and C. Gimenez (1990). "Arachidonic acid inhibits glycine transport in cultured glial cells." *Biochem J* **271**(1): 237-242.
- Zafra, F., C. Aragon, L. Olivares, N. C. Danbolt, C. Gimenez and J. Storm-Mathisen (1995a). "Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells." *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 3952-3969.
- Zafra, F., J. Gomeza, L. Olivares, C. Aragon and C. Gimenez (1995b). "Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS." *Eur J Neurosci* **7**(6): 1342-1352.
- Zeilhofer, H. U. (2005). "Synaptic modulation in pain pathways." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **154**: 73-100.
- Zeilhofer, H. U. (2008). "Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia." *Int Immunopharmacol* **8**(2): 182-187.
- Zeilhofer, H. U., H. Wildner and G. E. Yevnes (2012). "Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control." *Physiol Rev* **92**(1): 193-235.
- Zemkova, H., Z. Yan, Z. Liang, I. Jelinkova, M. Tomic and S. S. Stojilkovic (2007). "Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions." *J Neurochem* **102**(4): 1139-1150.
- Zhang, H. M., D. P. Li, S. R. Chen and H. L. Pan (2005). "M2, M3, and M4 receptor subtypes contribute to muscarinic potentiation of GABAergic inputs to spinal dorsal horn neurons." *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 697-704.
- Zhang, H. M., H. Y. Zhou, S. R. Chen, D. Gautam, J. Wess and H. L. Pan (2007). "Control of glycinergic input to spinal dorsal horn neurons by distinct muscarinic receptor subtypes revealed using knockout mice." *J Pharmacol Exp Ther* **323**(3): 963-971.
- Zhang, X., V. Verge, Z. Wiesenfeld-Hallin, G. Ju, D. Bredt, S. H. Snyder and T. Hokfelt (1993). "Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy." *J Comp Neurol* **335**(4): 563-575.
- Zhang, Y., L. P. Quock, E. Chung, Y. Ohgami and R. M. Quock (2011). "Involvement of a NO-cyclic GMP-PKG signaling pathway in nitrous oxide-induced antinociception in mice." *Eur J Pharmacol* **654**(3): 249-253.
- Zhou, X. and J. J. Galligan (1998). "Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture." *J Physiol* **513** ( Pt 3): 685-697.
- Zhuo, M., S. T. Meller and G. F. Gebhart (1993). "Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission." *Pain* **54**(1): 71-78.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**(4-5): 299-309.