



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Canales de calcio y dolor: Investigación del mecanismo de acción de la pregabalina sobre la neurotransmisión

Pablo Martínez San Segundo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Programa de doctorado en Biomedicina

**CANALES DE CALCIO Y DOLOR:  
INVESTIGACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN  
DE LA PREGABALINA SOBRE LA  
NEUROTRANSMISIÓN.**

Tesis Doctoral

**Pablo Martínez San Segundo**

Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular  
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental.  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona  
y  
Laboratorios del Dr. Esteve.

Director de Tesis: **Dr. Artur Llobet Berenguer**

Barcelona, 2019



La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda del Plan de Doctorados Industriales de la Generalitat de Catalunya (2014-DI-043 ESTEVE-Universitat de Barcelona-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge).

Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio de Neurobiología bajo la supervisión del Dr. Artur Llobet Berenguer dentro de las instalaciones del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (UB).



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

IDIBELL   
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

 DOCTORATS  
INDUSTRIALS

ESTEVE



*A mis padres*



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
<b>1. El dolor es una sensación compleja</b>	<b>6</b>
1.1 Definición y clasificación del dolor	6
1.2 Las vías de transmisión del dolor	8
1.2.1 Neuronas de primer orden	8
1.2.2 Neuronas de segundo orden	10
1.2.3 Vías centrales del dolor	11
<b>2. Dolor neuropático</b>	<b>12</b>
2.1 Epidemiología, etiología y evaluación clínica del dolor neuropático	13
2.2 Mecanismos del dolor neuropático	14
2.3 Fisiopatología del dolor neuropático	16
2.3.1 Sensibilización periférica	17
2.3.2 Sensibilización central	20
2.4 Tratamientos farmacológicos contra el dolor neuropático	22
<b>3. Gabapentinoides y la subunidad <math>\alpha 2\delta 1</math></b>	<b>31</b>
3.1 Gabapentinoides prototípicos: Pregabalina y gabapentina	32
3.2 Lugar de acción de los gabapentinoides	33
3.3 Papel de $\alpha 2\delta$ como receptor de los gabapentinoides	34
3.4 Funciones fisiológicas de la subunidad $\alpha 2\delta-1$	36
3.4.1 Implicación de $\alpha 2\delta-1$ en el dolor neuropático	36
3.4.2 Funciones moleculares de la subunidad $\alpha 2\delta-1$	38
3.5 Mecanismo de acción de los gabapentinoides: Posibles escenarios	41
3.6 Efectividad de los gabapentinoides	45
<b>4. Papel de los depósitos de vesículas sinápticas en la neurotransmisión</b>	<b>46</b>
4.1 Bases de la neurotransmisión	46
4.2 Las vesículas sinápticas se organizan en depósitos	47
4.3 Medidas del depósito de liberación rápida	49
4.4 Modalidades en la liberación de neurotransmisores	51
4.5 Los canales de calcio voltaje-dependientes en el terminal presináptico	54
4.6 Implicación de las neurexinas en la neurotransmisión	56
<b>5. Los canales de calcio como diana del dolor neuropático</b>	<b>58</b>
5.1 Los canales de calcio de tipo N como diana terapéutica	58
5.2 Desarrollo de ensayos para el cribado de alto rendimiento del canal de calcio de tipo N.	59

OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
<b>1. Cultivos celulares</b>	<b>64</b>
1.1 Cultivos primarios. Microcultivos de neuronas	64
1.1.1 Material	65
1.1.2 Procedimiento	67
1.2 Cultivos de líneas celulares	71
<b>2. Electrofisiología</b>	<b>72</b>
2.1 Experimentos de <i>Voltage-clamp</i>	73
2.1.1 Material	74
2.2 Análisis de los registros de <i>Voltage-clamp</i>	76
2.2.1 Estimación funcional del RRP	77
2.3 Registro de fluorescencia simultánea a la electrofisiología	78
2.4 Análisis de la fluorescencia simultánea a la electrofisiología	80
<b>3. Inmunofluorescencia</b>	<b>81</b>
<b>4. Producción de lentivirus mediante transfección de células HEK-293T</b>	<b>83</b>
4.1 Material	83
4.2 Procedimiento	85
<b>5. Infección con lentivirus de microcultivos de neuronas</b>	<b>88</b>
5.1. Procedimiento	89
<b>6. Ensayo de unión a radioligando</b>	<b>89</b>
6.1 Material	89
6.2 Procedimiento	90
<b>7. Ensayo de movilización de Calcio</b>	<b>92</b>
7.1 Procedimiento	93
7.2 Análisis de datos	95
<b>8. Western Blot</b>	<b>96</b>
<b>9. Estadística</b>	<b>98</b>

<b>RESULTADOS</b>	<b>99</b>
<b>1. Caracterización del efecto agudo de la pregabalina sobre la neurotransmisión</b>	<b>100</b>
<b>2. Regulación por <math>\alpha 2\delta</math>-1 de los componentes presináptico y postsináptico de la neurotransmisión en sinapsis autópticas</b>	<b>105</b>
2.1 Identificación del mecanismo de la depresión a corto plazo dissociando la actividad pre- y postsináptica	108
2.2 Efecto de los gabapentinoides sobre los terminales pre- y postsináptico	111
2.3 Identificación de las vesículas sinápticas sujetas al efecto regulatorio de la pregabalina	116
2.4 Contribución de las subunidades $\alpha 2\delta$ -1 intracelulares y sinápticas a la regulación aguda de la neurotransmisión	120
<b>3. Identificación de mecanismos reguladores de la actividad de <math>\alpha 2\delta</math>-1</b>	<b>121</b>
<b>4. Relación entre los niveles de <math>\alpha 2\delta</math>-1 y la regulación de la transmisión sináptica</b>	<b>126</b>
<b>5. Optimización del ensayo fluorimétrico de movilización de calcio para el cribado de alto rendimiento del canal iónico dependiente de voltaje Cav2.2</b>	<b>134</b>
5.1 Identificación de hits con potencial interés farmacológico	138
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>156</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>176</b>



# **ABREVIATURAS**



**A:** Amperios (derivados: nA, nanoamperio; pA, picoamperios)

**ADAM:** desintegrina y metaloproteinasa (unida a membrana)

**ATCs:** Antidepresivos Tricíclicos

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BSA:** Albúmina de suero bovino. Acrónimo del inglés *Bovine Serum Albumin*

**BDNF:** Factor Neurotrófico derivado del cerebro. Acrónimo del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext</sub>:** Concentración extracelular de calcio

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>int</sub>:** Concentración intracelular de calcio

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**CNTF:** Factor neurotrófico ciliar. Acrónimo del inglés *Ciliary Neurotrophic Factor*

**CSF-1:** Factor de estimulación colonial-1. Acrónimo del inglés *Colony Stimulating Factor-1*

**D.I.V.:** Días en cultivo. Acrónimo del inglés *Days In Vitro*

**DMEM:** Acrónimo del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*

**DMSO:** Dimetil-sulfóxido

**Dominio VWA:** dominio *Von Willebrand Factor A*

**Dominio LG:** dominio homólogo a Laminina G

**Dominio EGF:** dominio similar al Factor de Crecimiento Epidérmico

**EF:** Electrofisiología

**EGFP:** Proteína verde fluorescente intensificada. Acrónimo del inglés *Enhanced-GFP*

**EPSC:** Corriente postsináptica excitatoria. Acrónimo del inglés *Excitatory Postsynaptic Current*

**FBS:** Suero bovino fetal. Acrónimo del inglés *Fetal Bovine Serum*

**GBP:** Gabapentina

**GNDF:** Factor neurotrófico derivado de la glía. Acrónimo del inglés *Glial-derived neurotrophic factor*

**GFP:** proteína verde fluorescente. Acrónimo del inglés *Green Fluorescent Protein*

**Hz:** Hercios

**HTS:** Cribado de alto rendimiento. Acrónimo del inglés *High Throughput Screening*

**IASP:** Asociación Internacional para el Estudio del Dolor. Acrónimo del inglés: *International Association for the Study of Pain*

**I.F.:** Inmunofluorescencia. Acrónimo del inglés *Immunofluorescence*

**IRSN:** Inhibidores selectivos de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina

**min:** Minutos

**mEPSC:** Corriente postsináptica excitatoria en miniatura. Acrónimo del inglés *miniature Excitatory Postsynaptic Current*

**M.O.I.:** Multiplicidad de Infección. Acrónimo del inglés *Multiplicity Of Infection*

**mPSC:** Corriente postsináptica en miniatura. Acrónimo del inglés *miniature Postsynaptic Current*

**NeuPSIG:** Grupo de Interés Especial sobre el Dolor Neuropático. Acrónimo del inglés: *Special Interest Group on Neuropathic Pain.*

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso. Acrónimo del inglés *Nerve Growth Factor*

**PA:** Potencial de Acción

**PBS:** Tampón fosfato salino. Acrónimo del inglés *Phosphate Buffer Saline*

**P/E:** Penicilina/Estreptomycinia

**PGB:** Pregabalina

**PSC:** Corriente postsináptica. Acrónimo del inglés *Postsynaptic current*

**R.O.I.:** regiones de interés. Acrónimo del inglés *Region Of Interest*

**r.p.m.:** revoluciones por minuto

**RFU's:** Unidades de fluorescencia arbitrarias. Acrónimo del inglés *Relative Fluorescence Units*

**RP:** Depósito de reciclaje. Acrónimo del inglés *Recycling pool*

**RRP:** Depósito de vesículas de liberación rápida. Acrónimo del inglés *Readily Releasable Pool*

**RS:** Suero de rata. Acrónimo del inglés *Rat Serum*

**s:** Segundos (derivado: ms, milisegundos)

**SCM:** Microcultivo de una única célula. Acrónimo del inglés *Single-Cell Microculture*

**SGPA:** Sustancia Gris Periacueductal

**SP:** Sustancia P

**STD:** Depresión a corto plazo. Acrónimo del inglés *Short Term Depression*

**t:** Constante de tiempo

**TSP:** Trombospondina

**TTX:** Tetrodoxina

**UV:** Luz ultravioleta

**u.a.:** Unidades arbitrarias

**V:** Voltios (derivado: mV, milivoltios)

**VGCCs:** Canales de calcio voltaje-dependientes. Acrónimo del inglés *Voltage-gated calcium channels*.



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. EL DOLOR ES UNA SENSACIÓN COMPLEJA.

### 1.1 Definición y clasificación del dolor.

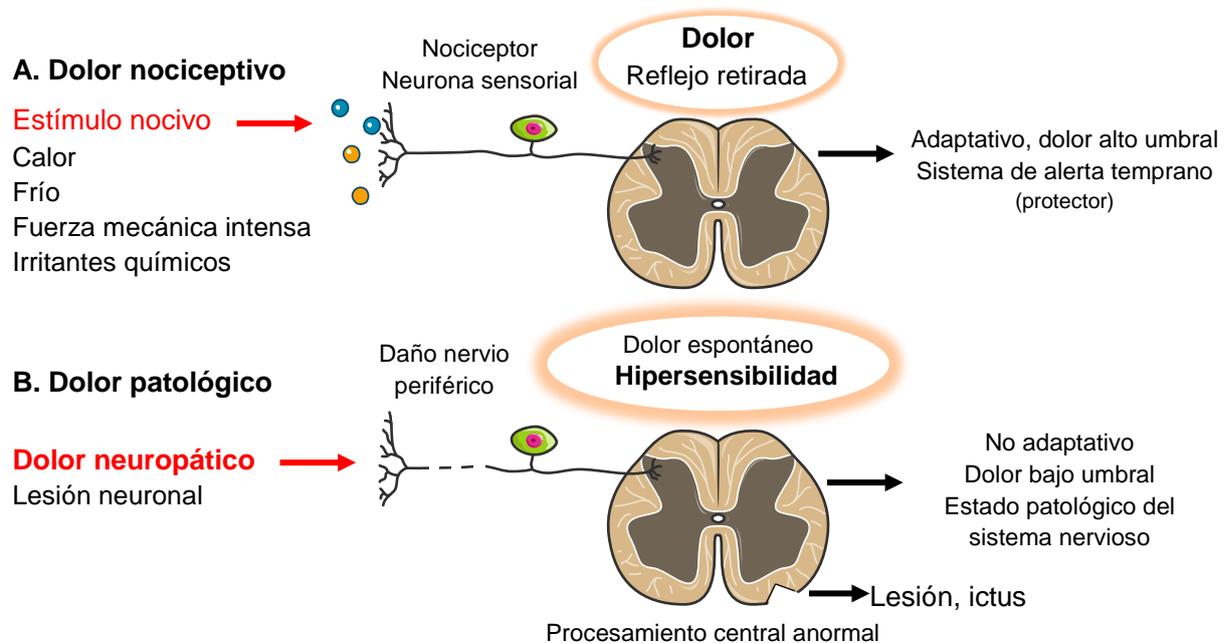
Habitualmente utilizamos el término “*dolor*” para referirnos a la percepción de un sentimiento o una sensación que describimos de forma variable como irritante, punzante, lacerante o incluso inaguantable. Sin embargo, el dolor no es sólo una sensación desagradable, sino que también es una compleja modalidad sensorial de supervivencia. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, del inglés *International Association for the Study of Pain*) define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable provocada por un daño tisular potencial o real.

Existen muchas maneras de clasificar el dolor (Tabla 1). Por ejemplo, considerando la duración sensorial, el **dolor agudo** actúa como una señal de alarma que desencadena la activación de las vías nociceptivas del sistema nervioso central para preservar su integridad. La mayoría de las veces el dolor termina una vez el estímulo doloroso se retira y el daño se ha curado. Sin embargo, a veces el dolor persiste en ausencia del estímulo original y continúa durante varios meses, pasando a ser considerado como **dolor crónico**. Esta distinción sólo tiene en cuenta la duración y no los mecanismos subyacentes. Contrariamente al dolor agudo, el dolor crónico es considerado una enfermedad *per se*, acompañado de alteraciones en la calidad de vida de los individuos, con un impacto en la familia, vida social y profesional (Maletic & Raison, 2009; Radat et al., 2013).

Clasificación	Tipo de dolor
Fisiología dolor	<p><b>Nociceptivo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Somático: músculo esquelético, cutáneo; fácil localización</li> <li>-Visceral: órganos huecos y músculo liso; frecuentemente es un dolor referido</li> <li>-Inflamatorio: apendicitis, artritis reumatoide, herpes zoster</li> </ul> <p><b>Neuropático:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Periférico: neuralgia postherpética, neuropatía diabética</li> <li>-Central: Lesión medular, dolor central post ictus.</li> </ul>
Intensidad del dolor	Leve-moderado-severo; escala de clasificación numérica del dolor del 0 al 10 (0=no dolor y 10=peor dolor imaginable)
Curso temporal	Agudo, crónico
Tejido implicado	Piel, músculos, visceral, articulaciones, tendones, huesos
Síndromes	Cancer, fibromialgia, migraña, postoperativo, otros

**Tabla 1. Clasificación del dolor.** El dolor puede clasificarse atendiendo a diferentes criterios como su fisiología, intensidad, características temporales, tipo de tejido afectado y/o al síndrome que lo causa. Algunas de estas clasificaciones pueden solaparse entre sí.

De manera general, atendiendo al mecanismo patofisiológico subyacente, el dolor puede clasificarse en dolor nociceptivo o en dolor neuropático. La IASP define el **dolor nociceptivo** como el dolor provocado por la activación de los nociceptores (por ejemplo el dolor inflamatorio). El término nocicepción (del latín *nocere*, “herir”) hace referencia al proceso sensorial que se desencadena y representa una función fisiológica vital con un papel protector para la supervivencia del organismo. Este dolor se desencadena durante episodios inflamatorios o en lesiones de tejidos a través de la liberación de mediadores que estimulan el sistema nociceptivo (Figura 1). Por el contrario, el **dolor neuropático** se define como el dolor iniciado o causado por una lesión primaria o debido a la disfunción del sistema nervioso periférico o central. Refleja un fenómeno patológico con origen en el sistema nervioso periférico (nervios, plexos, raíces y nódulos linfáticos sensitivos) o central (medula espinal y cerebro). El dolor neuropático puede inducirse por una gran variedad de situaciones patológicas en las que todas ellas, alteran la fisiología del sistema nervioso. Éste puede clasificarse como dolor neuropático periférico cuando está asociado a una lesión o disfunción en el SNP que causa dolor, como por ejemplo la neuralgia postherpética, la neuropatía diabética y la causalgia. Por otra parte, el dolor neuropático central está asociado con una lesión o disfunción del SNC, como el dolor central postictus o la lesión medular (Figura 1).



**Figura 1. Tipos de dolor.** Desde una perspectiva neurobiológica podemos clasificar el dolor en dos tipos principales: Nociceptivo: representa la sensación asociada con la detección potencial de estímulos nocivos y es protector (A) y neuropático: dolor patológico causado por un daño al sistema nervioso (B). Modificado a partir de: Woolf, 2010.

## 1.2 Las vías de transmisión del dolor.

Cuando recibimos un estímulo lo suficientemente intenso (por ejemplo un estímulo mecánico) se produce la activación de los nociceptores. Desde un punto de vista fisiológico, la estimulación de los nociceptores periféricos inicia una cascada de eventos en los que se liberan en la periferia moléculas inflamatorias pronociceptivas, que promueven la activación de los nociceptores. Estas moléculas inflamatorias pronociceptivas pueden venir de células dañadas (iones potasio, prostaglandinas, leucotrienos), las plaquetas (serotonina), el plasma (bradiquinina), mastocitos (histamina) y las neuronas aferentes primarias (substancia P, péptido relacionado al gen de la calcitonina, CGRP) (Basbaum et al., 2009). Estos mediadores influyen sobre el grado de actividad en el nervio aferente y como consecuencia, en la intensidad de la sensación del dolor (Marchand, 2008). Por tanto, una lesión que pueda producir un riesgo potencial en el organismo activará las neuronas aferentes primarias (neuronas de primer orden), que responden a la estimulación nociceptiva y transmiten esta información sensorial hacia la médula espinal a través de las fibras aferentes. La mayoría de las mismas son polimodales y responden a diferentes modalidades de estimulación, incluyendo la estimulación mecánica, térmica y química (Cordero-Erausquin et al., 2016).

### 1.2.1 Neuronas de primer orden.

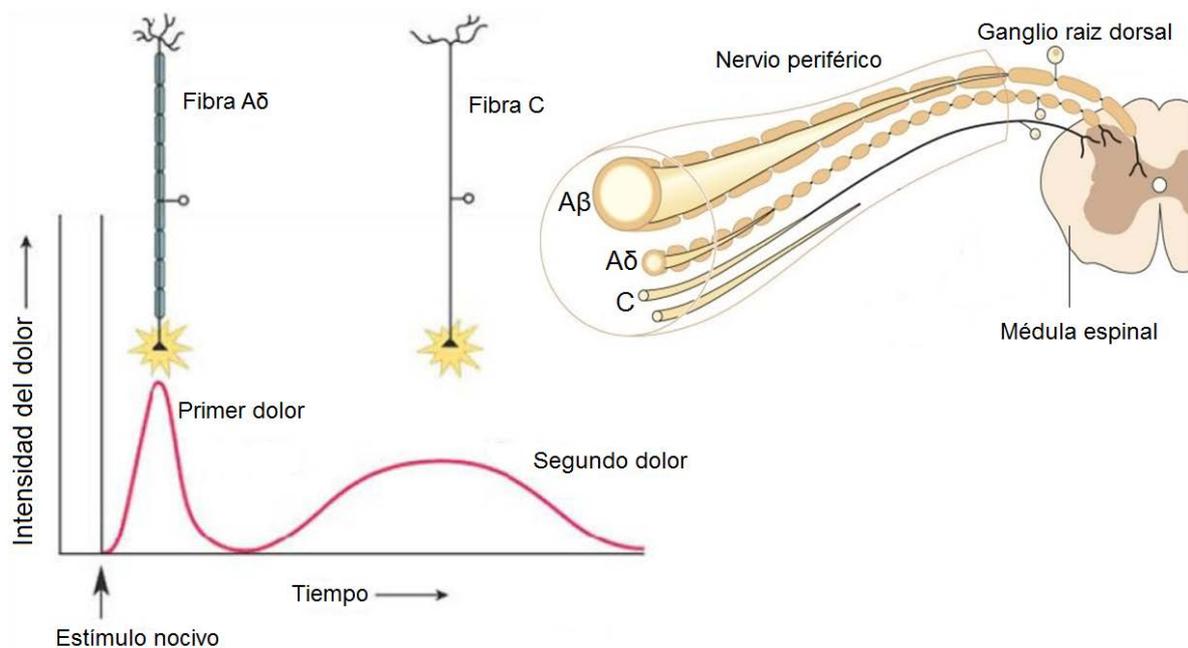
Los diferentes tipos de fibras transmisoras del dolor son los siguientes:

**Fibras A $\beta$ :** están principalmente implicadas en la conducción de información no nociceptiva como la vibración, el movimiento o el tacto suave. Además, cuando se reclutan también pueden tener un papel tónico inhibitorio sobre el estímulo nociceptivo. Excepcionalmente, cuando se sensibilizan debido a un dolor patológico, pueden promover la transmisión nociceptiva. Son fibras gruesamente mielinizadas (6-12 $\mu$ m) con una rápida velocidad de conducción (35-90m/s) (Smith & Lewin, 2009).

**Fibras A $\delta$ :** median el primer dolor rápido e intenso debido a la alta velocidad de conducción de estas fibras, conocido como primer dolor (Figura 2). Pueden dividirse en dos tipos en función de si transmiten información polimodal o proveniente de los mecanorreceptores (Abaira et al., 2017). Los mecanorreceptores responden principalmente a una estimulación mecánica intensa y también a una estimulación térmica intensa (fenómeno hiperalgesia). Las fibras polimodales A $\delta$  responden a

estimulación mecánica, térmica y química. Están menos mielinizadas que las A $\beta$  (1-6 $\mu$ m) y su velocidad de conducción también es alta (5-40m/s).

**Fibras C:** transmiten una sensación dolorosa difusa, leve y retardada, conocida también como dolor secundario o segundo dolor (Figura 2). La mayoría de ellas son polimodales, respondiendo a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Algunas sin embargo responden únicamente a estímulos mecánicos, estímulos térmicos de calor o estímulos térmicos de frío. Otro grupo identificado como fibras C 'silenciosas' o 'dormidas' no se activan normalmente por estímulos mecánicos o térmicos y únicamente responden a estos estímulos después de estar sensibilizadas, previa incubación con mediadores inflamatorios. Las fibras tipo C no están mielinizadas (0.2-1.5 $\mu$ m grosor del axón) y tienen velocidades de conducción bajas (0.5-2m/s) (Smith & Lewin, 2009).



**Figura 2. Las fibras aferentes primarias son clasificadas por su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción.** El rápido dolor inicial es mediado por las fibras A $\delta$  mielinizadas que tienen velocidades de conducción elevadas, mientras que las fibras tipo C no mielinizadas median el segundo dolor, debido a su baja velocidad de conducción. Imagen izquierda extraída de: Hendry & Hsiao, 2013. Imagen derecha modificada de: <https://clinicalgate.com/pain-pathophysiology-and-management-2/>

Las fibras nociceptivas también se pueden clasificar atendiendo a marcadores específicos que definen subconjuntos específicos de diversas poblaciones neuronales. De acuerdo a los receptores neurotróficos que expresan las neuronas nociceptivas se pueden clasificar en:

**TrkA positivas:** son neuronas que expresan el receptor TrkA, sensible a la neurotrofina NGF (*nerve growth factor*). A esta población de neuronas se les

denominan nociceptores de tipo C peptidérgicos, ya que liberan los neuropéptidos CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y la sustancia P (SP).

**c-Ret positivas:** son neuronas que expresan el receptor neurotrófico c-Ret, sensible a la neurotrofina GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*). Los nociceptores de tipo C no peptidérgicos están principalmente compuestos por neuronas c-Ret positivas. La mayoría de estas neuronas también unen la isolectina IB4 y expresan subtipos específicos de receptores purinérgicos, como P2X<sub>3</sub> (Basbaum et al; 2009)

Otros marcadores asociados a poblaciones neuronales concretas incluyen los canales iónicos permeables a calcio. Por ejemplo, el receptor del frío/mentol **TRPM8** y el receptor vaniloide del calor **TRPV1** se segregan en diferentes clases de nociceptores que no solapan entre sí (Cordero-Erausquin et al., 2016).

Cuando son reclutadas, las fibras nerviosas aferentes A $\beta$ , A $\delta$  y C proyectan hacia las diferentes láminas del asta dorsal de la médula espinal (láminas de Rexed). Las fibras A $\beta$  proyectan hacia las láminas profundas de la médula espinal, concretamente establecen sinapsis con neuronas de las láminas III, IV y V; mientras que las fibras A $\delta$  proyectan en las láminas superficiales I y II y además en la lámina V; y las fibras C en las láminas superficiales I y II (Basbaum et al., 2009). Por lo tanto, las neuronas de las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (láminas I y II) reciben fundamentalmente información específica nociceptiva a través de las fibras aferentes primarias A $\delta$  y las fibras tipo C.

### 1.2.2 Neuronas de segundo orden.

El asta dorsal de la médula espinal es el centro de procesamiento sensorial esencial en el SNC, conectando la periferia con el cerebro. En esta vía nociceptiva las neuronas de la médula espinal, denominadas neuronas de segundo orden, integran la información de los nociceptores periféricos, de las interneuronas locales y de las proyecciones descendentes y transmiten las señales procesadas hacia áreas supraespinales, hasta los centros superiores cerebrales. Las neuronas de segundo orden se dividen en tres clases dependiendo de la información recibida por las neuronas aferentes de primer orden (Craig, 2003; Marchand, 2008):

**Neuronas específicas nociceptivas:** responden únicamente a la estimulación nociceptiva térmica y mecánica. Estas neuronas están implicadas en codificar la

localización del dolor. Las neuronas específicas nociceptivas son activadas por las fibras A $\delta$  y C y se localizan en las láminas I y II.

**Neuronas de amplio rango dinámico** (WDR, *wide dynamic range*): responden gradualmente a estímulos que van desde inocuos a nociceptivos, ya que reciben información de las fibras A $\beta$ , A $\delta$  y C. Su campo de recepción es dinámico cambiando en condiciones de dolor permanente. Estas neuronas se localizan en láminas profundas, concretamente en las láminas IV, V y X.

**Neuronas no nociceptivas:** responden a estímulos inocuos térmicos y mecánicos de baja intensidad, y también a estímulos propioceptivos. Se localizan principalmente en las láminas I, II, III y IV.

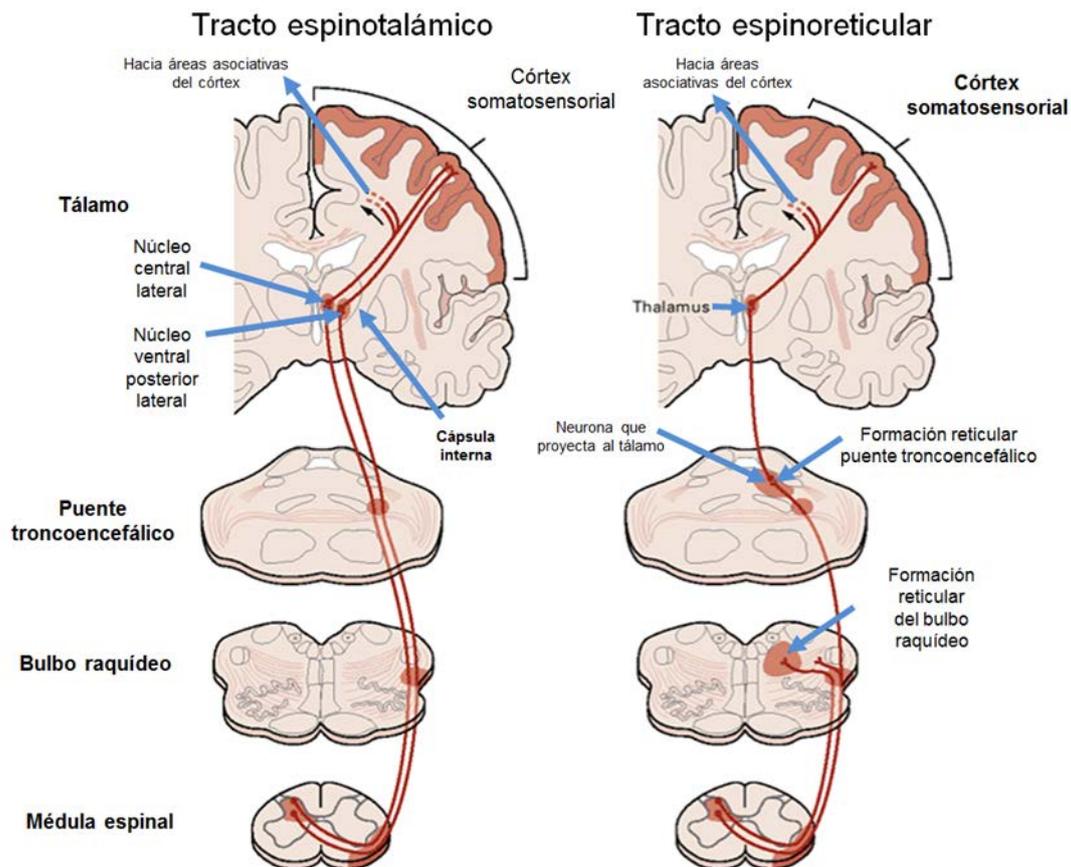
### 1.2.3 Vías centrales de dolor.

Las neuronas de segundo orden viajan a centros superiores a través de dos principales vías: el tracto espinotalámico sensorial y el tracto espinorreticular (Villanueva et al., 2006).

**Tracto espinotalámico:** Los axones de las neuronas de segundo orden que forman el tracto espinotalámico llevan la información sensorial a través de la línea media de la médula espinal, cerca del canal central, antes de ascender por las columnas laterales y continuar hacia el tálamo. Los axones del tracto decusan a nivel de la médula espinal, generalmente uno o dos segmentos por encima del punto de entrada, viajando a lo largo de la médula espinal hasta el tronco cerebral. El tracto ascendente se desplaza dorsalmente después de pasar por médula ventromedial rostral y finalmente, los axones establecen sinapsis con neuronas de tercer orden, concretamente en los núcleos ventral posterior lateral y ventral posterior medial del tálamo. Desde allí, las señales continúan hacia el córtex somatosensorial. Las fibras del tracto espinotalámico conducen rápidamente las señales y están implicadas principalmente en los aspectos discriminativos del dolor, como sería la localización de los estímulos dolorosos.

**Tracto espinorreticular:** La vía surge a partir de neuronas de segundo orden en la médula espinal. Sus axones ascienden en columnas por la materia blanca contralateral de la médula hasta el tallo cerebral estableciendo sinapsis con neuronas de la formación reticular. Las neuronas de tercer orden del tracto espinorreticular continúan viajando hasta el tálamo y las neuronas de cuarto orden

llevan la información al córtex cerebral. La función de este tracto es causar alerta y excitación en respuesta a un estímulo doloroso. Además, las neuronas de segundo orden del tracto espinoreticular también establecen sinapsis con neuronas de la sustancia gris periacueductal (SGPA) en el mesencéfalo, área implicada en la modulación de la transmisión nociceptiva. Esta estructura está comunicada con las áreas límbicas del cerebro (córtex cingulado anterior, insular y prefrontal), áreas implicadas en el impacto afectivo del dolor (Bushnell et al., 2013).



**Figura 3. Principales vías ascendentes del dolor.** Las neuronas de segundo orden de la médula espinal viajan a los centros superiores cerebrales a través de dos principales vías: el tracto espinotalámico sensorial y el tracto espinoreticular. En su recorrido establecen sinapsis con neuronas de diferentes núcleos entre los que se encuentra el tálamo. Las neuronas de tercer orden que surgen de esta estructura proyectan hacia estructuras del sistema límbico o a varias regiones corticales que en su conjunto forman la 'matriz del dolor' (córtex somatosensorial primario y secundario, insular, cingulado anterior y córtex prefrontal). Modificado de: <<http://humanphysiology.academy/contents.html>>

## 2. DOLOR NEUROPÁTICO.

Entender el proceso por el cual se pasa de tener una percepción fisiológica del dolor a que el dolor se convierta en una patología, así como conocer cuáles son las causas y los mecanismos que originan el dolor neuropático, son de vital importancia para poder mejorar los tratamientos actuales existentes contra el dolor neuropático.

## 2.1 Epidemiología, etiología y evaluación clínica del dolor neuropático.

La prevalencia exacta del dolor neuropático en la población global no se conoce con exactitud pero la mayoría de los estudios estiman que entre un 1.5 y 8% de la población sufre dolor neuropático, lo que equivale a entre 100 y 560 millones de personas en el mundo (Alles & Smith, 2018). El dolor neuropático está asociado con un grupo heterogéneo de condiciones médicas que abarcan un número elevado de etiologías, originándose debido a mecanismos muy diversos: compresión (síndrome del túnel carpiano), metabólicos (hipotiroidismo), infecciosos (VIH), isquémicos (diabetes), tóxicos (alcohol) y/o traumáticos (lesión medular). Además, en una condición médica específica pueden asociarse más de un mecanismo que produzca dolor neuropático. Por ejemplo, en la neuralgia postherpética, se han identificado mecanismos infecciosos, inflamatorios e isquémicos.

Condición que causa dolor neuropático	Incidencia	Prevalencia
Neuropatía diabetica dolorosa	15.3/100000	15%
Neuralgia postherpética	11-40/100000	7-27%
Neuropatía dolorosa relacionada al VIH	Datos inadecuados	35%
Neuropatía dolorosa relacionada al SIDA	Datos inadecuados	50%
Neuralgia del trigémino	5-8/100000	Datos inadecuados
Dolor del miembro fantasma	Datos inadecuados	53-85%
Dolor central post-ictus	Datos inadecuados	8-11%
Dolor neuropático relacionado con esclerosis múltiple	Datos inadecuados	23%
Dolor neuropático relacionado con lesión medular	Datos inadecuados	40-70%

**Tabla 2. Resumen de la incidencia y prevalencia de las diferentes condiciones que causan dolor neuropático.** Los datos de la incidencia se extraen de la población global, mientras los datos de la prevalencia se refieren a la proporción de los pacientes con una enfermedad que además presentan dolor neuropático Modificado de: Sadosky et al., (2008).

La presencia de dolor neuropático se diagnostica exclusivamente en base a criterios clínicos. El motivo es la ausencia de biomarcadores de dolor. De acuerdo a los criterios del grupo NeuPSIG (Finnerup et al., 2016), el dolor es considerado como neuropático si la historia clínica del paciente es compatible con la presencia de una lesión o enfermedad neurológica, si el dolor tiene una distribución neuroanatómica perceptible y si la examinación clínica revela déficits sensoriales y/o hiperalgesia o alodinia en las mismas áreas neuroanatómicas del cuerpo. La examinación sensorial es una parte crucial para el proceso diagnóstico del dolor neuropático. Su objetivo es detectar posibles anomalías que sugieran una lesión en el sistema somatosensorial, principalmente déficits sensoriales mecánicos y/o térmicos. Varias pruebas, como

una electromiografía estándar, técnicas de imagen de la médula espinal o el cerebro, así como una biopsia de la piel o de los nervios, pueden ser útiles para una caracterización detallada de las potenciales lesiones neurológicas que sustentan el dolor. Sin embargo, ha de acentuarse que estas pruebas no miden el dolor *per se* y no pueden confirmar directamente la relación causal entre la lesión identificada y el dolor. Por ello, el diagnóstico del dolor neuropático depende del juicio de los clínicos y de la interpretación de los resultados observados en los test.

## **2.2 Mecanismos del dolor neuropático.**

El dolor neuropático se origina por una sensibilización. Pero, ¿qué es exactamente la sensibilización? La IASP define la sensibilización como el incremento en la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas a un estímulo corriente y/o su reclutamiento en respuesta a estímulos por debajo de su umbral de activación habitual. Cuando nos referimos a la sensibilización podemos diferenciar dos procesos principales: la sensibilización periférica y la sensibilización central.

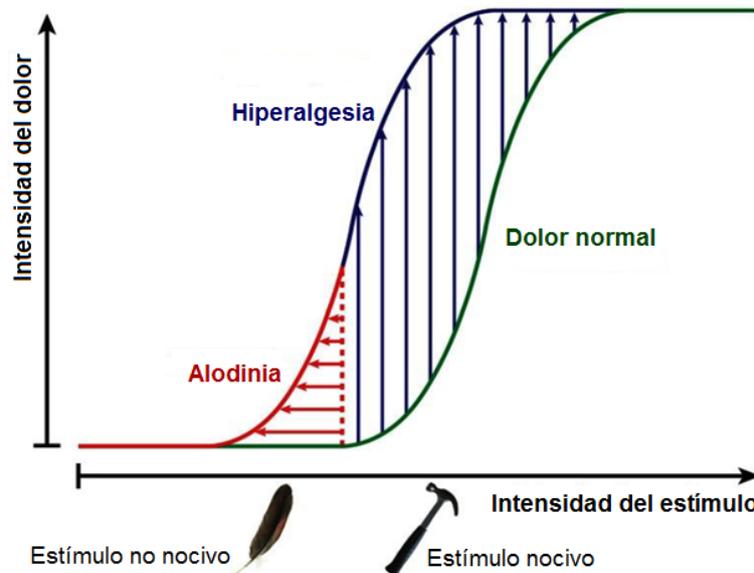
La **sensibilización periférica** se produce como consecuencia de una reducción en el umbral de activación de los nociceptores periféricos y del aumento en su capacidad de respuesta al estar expuestos a diversos factores inflamatorios (citoquinas, bradiquinina, neuropeptidos o prostaglandinas). Como consecuencia de la hiperactividad del nociceptor periférico, se pueden producir cambios secundarios en la actividad de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, produciéndose finalmente la sensibilización central (Latremoliere & Woolf, 2009).

El término **sensibilización central** se refiere a un estado en el que las neuronas del asta dorsal de la médula espinal se encuentran hiperexcitadas de manera incesante debido a un estado de dolor persistente (Woolf, 1983; Woolf, 2011). Este fenómeno comparte similitudes con el fenómeno de la potenciación a largo plazo implicado en la plasticidad sináptica (Hulsebosch et al., 2009).

Término	Definición
<b>Dolor</b>	Experiencia sensorial y emocional desagradable provocada por un daño tisular potencial o real.
<b>Alodinia</b>	Dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor
<b>Analgesia</b>	Ausencia de dolor en respuesta a una estimulación que normalmente es dolorosa
<b>Hiperalgnesia</b>	Incremento del dolor por un estímulo que normalmente produce dolor.
<b>Hipoalgnesia</b>	Disminución del dolor por un estímulo que normalmente produce dolor.
<b>Dolor neuropático</b>	Dolor iniciado o causado por una lesión primaria o debido a la disfunción del sistema nervioso periférico o central
<b>Nocicepción</b>	Proceso neural por el que se codifica un estímulo nocivo.
<b>Dolor nociceptivo</b>	Dolor que surge por un daño actual o amenazante en tejido no neural y que es debido a la activación de los nociceptores.
<b>Estímulo nociceptivo</b>	Evento actual o potencialmente dañino transducido y codificado por los nociceptores.
<b>Nociceptor</b>	Receptor sensorial de alto umbral localizado en el sistema nervioso somatosensorial periférico que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos.
<b>Umbral del dolor</b>	Intensidad mínima de un estímulo para que sea percibido como doloroso
<b>Sensibilización central</b>	Incremento en la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas hacia un estímulo normal y/o reclutamiento de las mismas en respuesta a un estímulo situado por debajo del umbral de detección normal.

**Tabla 3.** Glosario con definiciones de diferentes términos relacionados con el dolor.

Los procesos de sensibilización periférica y central pueden ayudar a que se desarrollen los síntomas sensoriales que se manifiestan comúnmente en pacientes que sufren dolor neuropático, incluyéndose la alodinia, la hiperalgnesia y el dolor espontáneo (Jensen & Finnerup, 2014). La **alodinia** es una sensación dolorosa generada por un estímulo que normalmente no se percibe como doloroso, mediada por las fibras nerviosas aferentes termosensibles o de bajo umbral mecánico (Lolignier et al., 2015). La **hiperalgnesia** se refiere al incremento en la sensación del dolor, generado por un estímulo doloroso normal. Es mediado por fibras tipo C mecánicas y térmicas. Por su parte, el dolor espontáneo aparece por la generación de impulsos ectópicos en la vía nociceptiva y está presente en numerosas condiciones clínicas como la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, la endometriosis y la migraña (Woolf, 2011).



**Figura 4. Sensibilización al dolor.** La alodinia se define como la sensación de dolor generada por un estímulo no nocivo, mediado por fibras nerviosas aferentes mecánicas o térmicas de bajo umbral; mientras que la hiperalgesia se define como un incremento en la sensación de dolor generado por un estímulo normalmente doloroso y mediado presumiblemente por las fibras tipo C. Modificado de: Laignier et al., 2015.

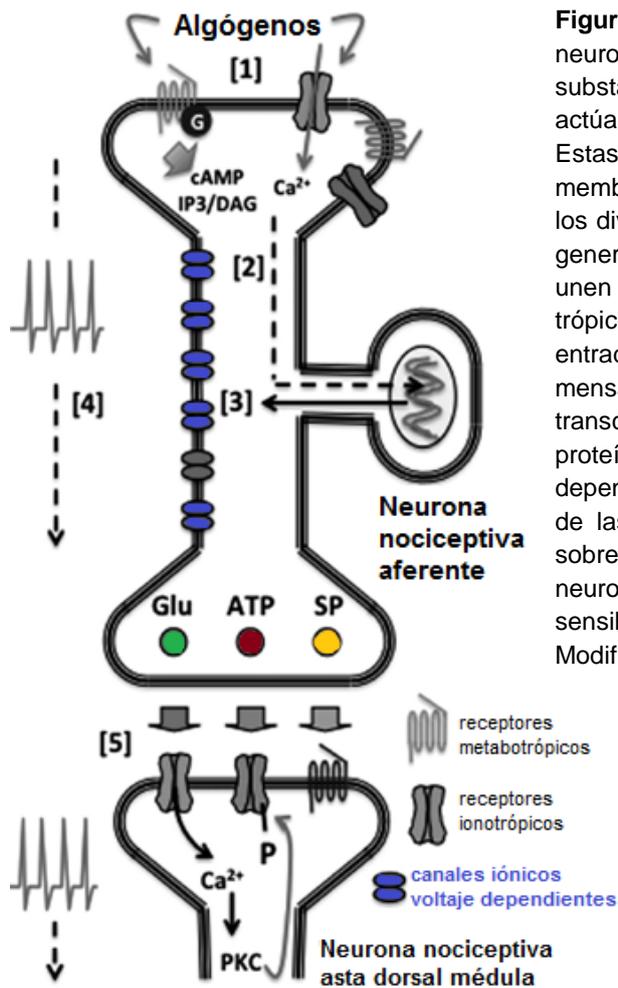
### 2.3 Fisiopatología del dolor neuropático.

Diversos estudios experimentales han descrito varios mecanismos patofisiológicos como los principales responsables de desencadenar dolor neuropático. Entre ellos los más relevantes se asocian a la sensibilización de los nociceptores, a la actividad ectópica y espontánea de las fibras nociceptivas aferentes y a la sensibilización central. Se producen cambios en la expresión molecular de canales iónicos, neurotransmisores y receptores en los axones nociceptivos, así como en los cuerpos celulares de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal. A nivel de la médula espinal se produce la sensibilización de neuronas de segundo orden, cambios en la expresión de neurotransmisores, neuropéptidos y receptores, la reactivación glial seguida de la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias y finalmente, una reorganización morfológica y funcional en las proyecciones aferentes de la médula espinal (Latremoliere & Woolf, 2009; Waxman & Zamponi, 2014; Boadas-Vaello et al., 2016).

### 2.3.1 Sensibilización periférica.

La sensibilización periférica resulta comúnmente de cambios asociados al entorno químico inflamatorio. Varios estudios experimentales han demostrado que lesiones en nervios periféricos así como la inflamación de la piel, de articulaciones musculares u órganos internos, pueden causar cambios fenotípicos en las fibras aferentes sensoriales. Estos cambios se producen por un aumento en el flujo de calcio intracelular en las fibras aferentes o por la interacción de los mediadores inflamatorios con sus respectivos receptores localizados en la membrana celular de las fibras aferentes (Boadas-Vaello et al., 2016). Los mediadores inflamatorios son liberados por los nociceptores activados y por las células no neurales que residen o se infiltran y acumulan en la zona lesionada (mastocitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos). Colectivamente estos factores son denominados '*sopa inflamatoria*' e incluyen diversas moléculas de señalización como neuropéptidos (CGRP, SP, bradiquinina), neurotransmisores, citoquinas, eicosinoides y lípidos relacionados (prostaglandinas, endocannabinoides), neurotrofinas, quimiocinas, así como proteasas extracelulares y protones (Basbaum et al., 2009).

Estas señales extracelulares inducen cambios en la expresión de genes, produciéndose una sobreexpresión de canales iónicos voltaje-dependientes (Cummins et al., 2007; Waxman & Zamponi, 2014; Daou et al., 2016) de ligandos y de receptores metabotrópicos en las neuronas aferentes nociceptivas. Las principales consecuencias funcionales por los cambios fenotípicos mencionados son un incremento de la sensibilización en los nociceptores por su exposición a los diferentes algógenos, así como un incremento en la despolarización de los nociceptores por la sobreexpresión de varios canales de sodio voltaje-dependientes (Nav1.3 y Nav1.7) que provocan un incremento en la generación de potenciales de acción así como en su propagación a través de las fibras nociceptivas. La hiperexcitabilidad de los nociceptores produce un incremento de la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos (glutamato, SP, CGRP, ATP) a las neuronas nociceptivas de segundo orden en la médula espinal, incluyendo las neuronas específicas nociceptivas, las neuronas *WDR* e interneuronas tanto excitatorias como inhibitorias (Figura 5).



**Figura 5. Mecanismos de sensibilización periférica.** Las neuronas nociceptivas de primer orden liberan glutamato, substancia P (SP), CGRP y adenosina trifosfato (ATP) que actúan como neurotransmisores y neuromoduladores. Estas neuronas tienen una serie de receptores de membrana y canales iónicos donde pueden interaccionar los diversos algógenos. Cuando se produce una lesión, se generan una serie de mediadores algogénicos (1) que se unen a los canales iónicos o a los receptores metabotrópicos de los nociceptores, aumentando el flujo de entrada de iones de calcio y la generación de segundos mensajeros (2). Los mediadores intracelulares facilitan la transcripción de ciertos genes y la translocación de nuevas proteínas, como por ejemplo canales iónicos voltaje-dependientes (3), que contribuyen a la hiperexcitabilidad de las fibras nociceptivas aferentes (4). Estas neuronas sobreexcitadas liberan más neurotransmisores en las neuronas de la médula espinal (5), contribuyendo así a la sensibilización de neuronas en la médula espinal. Modificado de: Boadas-Vaello et al. (2016)

El incremento en la actividad de los nociceptores se produce como consecuencia de los cambios moleculares en la expresión de varios canales iónicos (Tabla 4). Diferentes mediadores algogénicos inflamatorios como la IL-1 $\beta$ , IL-6, prostaglandinas o el factor de necrosis tumoral (TNF), interaccionan con los canales iónicos de las neuronas primarias aferentes e instigan una actividad ectópica en estas neuronas, lo cual contribuye al dolor espontáneo, estímulo-independiente (Pitcher & Henry, 2008). De hecho, se ha descrito que después de que se produzca una lesión en un nervio periférico, hay una actividad sináptica alterada en las neuronas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal sin que se vean alteradas sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas, lo cual sugiere que la actividad de las neuronas periféricas puede inducir cambios en el sistema nervioso central (Balasubramanyan et al., 2006; Devor, 2006). Este hecho es consistente con la necesidad de una actividad ectópica continuada en los nervios periféricos para producir y mantener la sensibilización central. Por ejemplo, un incremento en la actividad de las fibras aferentes primarias produce una sobreexpresión de la

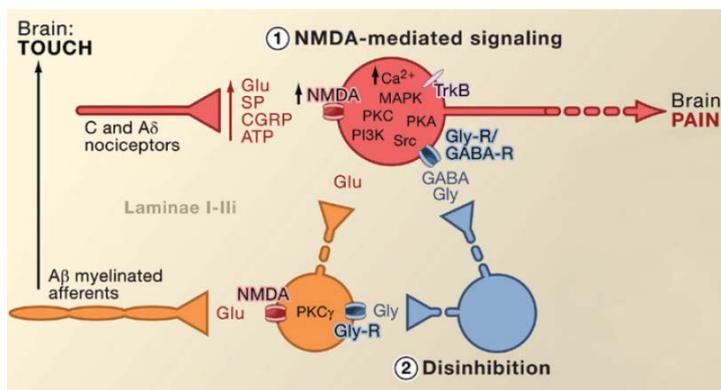
subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de calcio voltaje-dependientes. Esta sobreexpresión altera la función del canal de calcio en el terminal aferente primario, incrementando la liberación de neurotransmisores (Alles & Smith, 2018). Por otro lado, el incremento en la corriente de varios canales de sodio voltaje-dependientes, entre los que se incluyen los canales Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, contribuye al aumento en la excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal. Además, un incremento en la actividad de las neuronas que expresan el canal TRPV1 puede contribuir a la sensibilización central de forma indirecta, incrementando la permeabilidad de las barreras hematoencefálica y hematoespinal (Beggs et al., 2010), permitiendo el acceso de citoquinas proinflamatorias, linfocitos T y macrófagos.

Clase receptor/ canal iónico	Resultado del cambio	
Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9	Hiperexcitabilidad en las fibras A $\delta$ y C. Incremento en la conducción nerviosa. Generación de descargas ectópicas	Incremento expresión
Cav2.1 (P/Q) Cav2.2(N)	Incremento en la liberación de neurotransmisores en neuronas nociceptivas de la médula espinal. Sensibilización nociceptores	Incremento expresión
<b>Subunidad <math>\alpha 2\delta</math>-1</b>	Incrementan la hiperexcitabilidad en las fibras nociceptivas. Genera alodinia mecánica al sensibilizarse las fibras A $\beta$	Incremento expresión
Canal iónico HCN	Despolarización favorecida en presencia de estímulos inflamatorios (prostaglandinas, NO). Incremento liberación de neurotransmisores en neuronas de la médula espinal.	Incremento expresión
Canal iónico ASIC	Fácilmente despolarizado por iones hidrógeno. Incremento liberación de neurotransmisores en neuronas de la médula espinal.	Incremento expresión
Receptores purinérgicos P2X	Favorecen la neurotransmisión	Incremento expresión
Receptores TRP: vaniloide (TRPV1), melastatina (TRPM8)	Despolarización favorecida en presencia de estímulos inflamatorios. Incremento liberación de neurotransmisores en neuronas de la médula espinal.	Incremento expresión
Canales K <sup>+</sup> sensibles a ATP	Incrementan la hiperexcitabilidad en las fibras nociceptivas.	Descenso expresión

**Tabla 4. Principales cambios moleculares en los nociceptores después de una lesión.** La actividad alterada de los nociceptores resulta de cambios en las propiedades y/o expresión de varios tipos de canales entre los que se encuentran los canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes (Cummins et al., 2007; Waxman & Zamponi, 2014; Daou et al., 2016), canales iónicos de la familia de los receptores de potencial transitorio, TRP (Basso & Altier, 2017) y de la familia HCN denominados canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (Young et al., 2014). Además se producen cambios en la función de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPases (Ventéo et al., 2016) y en el manejo de calcio intracelular (D'Arco et al., 2015).

### 2.3.2 Sensibilización central.

Después de que se produzca una lesión periférica o debido a una neuropatía, la sensibilización central dentro de la médula espinal resulta de cambios en la transmisión sináptica: los procesos sinápticos excitatorios se potencian mientras que los procesos inhibitorios se atenúan, debido a la pérdida de los controles inhibitorios tónicos. Como resultado se establece un estado de hiperexcitabilidad en el sistema nervioso central que conlleva un aumento en el procesamiento de la información nociceptiva (Woolf, 1983; Latremoliere & Woolf; 2009).



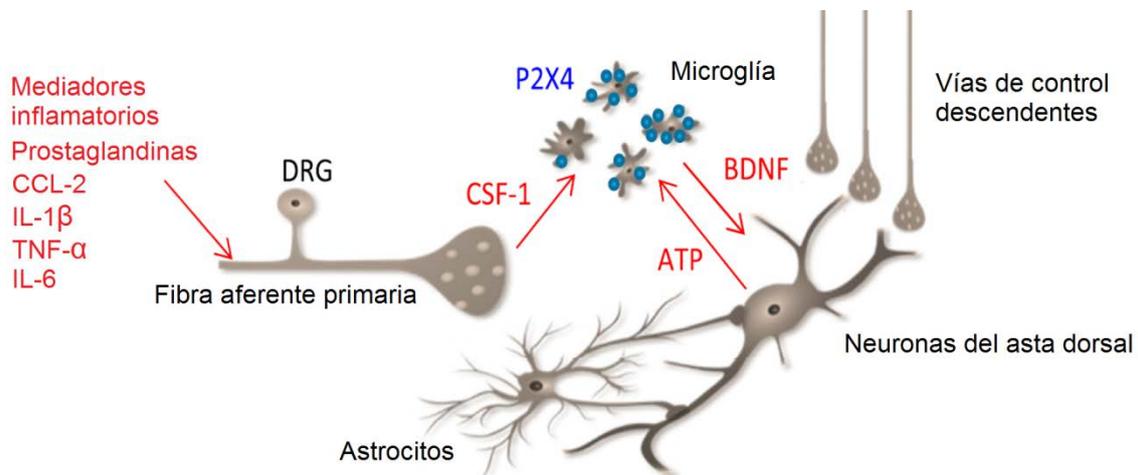
**Figura 6. Mecanismos de sensibilización central.** 1) Potenciación de los procesos sinápticos excitatorios. 2) Desinhibición o pérdida de los controles inhibitorios tónicos. Modificado de: Basbaum et al., 2009

A nivel de la médula espinal, los neurotransmisores y neuropéptidos liberados (glutamato, ATP, SP, CGRP) interactúan con los receptores AMPA, kainato, receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), el receptor de la neuroquinina-1 (NK1R) y receptores purinérgicos (P2X) de las neuronas de segundo orden nociceptivas. La sumación de corrientes excitatorias postsinápticas (EPSCs) en las neuronas postsinápticas resulta en la propagación de los potenciales de acción y en la consecuente transmisión de señales dolorosas hacia las neuronas de centros superiores. De hecho, esta neurotransmisión causa una entrada de iones calcio en las neuronas nociceptivas de segundo orden de la médula espinal, dando lugar a la activación de cascadas intracelulares calcio-dependientes y a la sobreexpresión de receptores de membrana (Tabla 4).

Además, la lesión de un nervio periférico puede causar un descenso en las corrientes postsinápticas inhibitorias en neuronas de las capas superficiales de la médula espinal. Las interneuronas inhibitorias GABAérgicas o glicinérgicas se encuentran densamente distribuidas en las capas superficiales de la médula espinal y un descenso en la inhibición tónica de las mismas, aumenta la despolarización y excitación de las neuronas que proyectan a los centros superiores. También hay

estudios que indican que la desinhibición ocurre por cambios en las neuronas *per se* que proyectan hacia centros superiores. Concretamente, debido a la desregulación en la expresión del cotransportador KCC2 de iones  $K^+$  y  $Cl^-$  que se expresa en neuronas de la lámina I que proyectan a los centros superiores. Esta desregulación produce un cambio en el gradiente de iones cloruro, de manera que la activación de los receptores GABA-A despolariza, en lugar de hiperpolarizar, las neuronas de la lámina I que proyectan hacia los centros superiores. En consecuencia, aumenta la excitabilidad e incrementa la transmisión de las señales nociceptivas (Alles & Smith, 2018).

Las células gliales, principalmente la microglía y los astrocitos, también contribuyen al proceso de sensibilidad central en el entorno de la lesión. Después de producirse una lesión en un nervio periférico, en cuestión de horas la microglía se acumula en la zona superficial de la médula espinal. Las células microgliales activadas sintetizan y liberan citoquinas (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas, quimiocinas (CCL2) y óxido nítrico que actúan aumentando la sensibilización central neuronal y el dolor persistente inducido por la lesión en el nervio.



**Figura 7. Reactivación glial durante la sensibilización central.** Estudios recientes implican directamente al factor de estimulación colonial-1 (CSF-1) como el primer efector del cambio de fenotipo que se produce en la microglía en estados de dolor neuropático (Guan et al., 2016). Diferentes mediadores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  promueven la inducción de CSF-1 en las fibras aferentes primarias (Lim et al., 2017). CSF-1 provoca el cambio fenotípico de la microglía que pasa a expresar nuevos receptores como el receptor purinérgico ionotrópico P2X4. El ATP liberado por las neuronas secundarias de la médula espinal interacciona con estos receptores de la microglía (P2X4) y promueven a su vez la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), produciéndose como resultado final un aumento en la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal. Modificado de: Alles & Smith (2018)

Todos los cambios fisiopatológicos descritos anteriormente, tanto los que suceden a nivel periférico como a nivel espinal y supraespinal, contribuyen al desarrollo del

dolor neuropático expresado en las diferentes condiciones causantes del dolor. Los procesos moleculares descritos con anterioridad llevan a:

- Sensibilidad exacerbada en las neuronas de segundo orden.
- Descenso en los umbrales para generar y propagar los potenciales de acción.
- Incremento en la actividad espontánea.
- Facilitación sináptica.
- Descenso transmisión sináptica (desinhibición).
- Aumento en la capacidad de respuesta a estímulos evocados: conversión de las neuronas específicas nociceptivas en neuronas *WDR* que responden tanto a estímulos inocuos como nocivos.

Los citados cambios sinápticos a largo plazo llevan a una activación persistente del tracto espinotalámico provocando las consecuencias observadas en condiciones de sensibilización central como la alodinia, la hiperalgesia y el dolor espontáneo, presentes de forma habitual en pacientes que sufren dolor neuropático (Jensen & Finnerup, 2014).

#### **2.4 Tratamientos farmacológicos contra el dolor neuropático.**

La farmacoterapia del dolor neuropático permanece como un reto ya que sigue siendo frecuentemente insatisfactoria. Los analgésicos son poco efectivos o directamente inefectivos aliviando el dolor neuropático. Entre los actuales analgésicos utilizados sólo el tramadol y algunos opioides fuertes (morfina, oxicodona) han demostrado evidencias de aliviar de forma parcial el dolor neuropático. En 2007, el Grupo de Interés Especial en Dolor Neuropático (NeuPSIG), un grupo internacional de expertos en dolor neuropático, propuso unas normas generales basadas en evidencias para el tratamiento farmacológico del dolor neuropático (Dworkin et al., 2007). Los fármacos de primera línea recomendados por NeuPSIG y otras sociedades del estudio del dolor son: antidepresivos tricíclicos (ATCs), inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina/noradrenalina (IRSN) y los gabapentinoides. En 2015 NeuPSIG actualizó estas directrices (Finnerup et al., 2015) manteniendo a los ATCs, gabapentinoides y a la duloxetina como los fármacos más recomendados en el tratamiento de varias condiciones de dolor neuropático.

### 2.4.1 Tratamientos de primera línea.

La eficacia de los **antidepresivos tricíclicos** proviene de observaciones en pacientes con depresión tratados con imipramina en los años 60. Los ATCs tienen eficacia demostrada especialmente en la neuralgia postherpética y neuropatía diabética periférica. Estos efectos son independientes de la presencia del síndrome depresivo y además, el alivio en el dolor se produce de manera independiente a la etiología del dolor neuropático. Su mecanismo de acción predominante es impedir la recaptación de la serotonina y la noradrenalina, incrementando la concentración sináptica de estos neurotransmisores en el encéfalo. Además actúan sobre canales iónicos, reduciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , e interaccionan con receptores de NMDA y adenosina (Vranken, 2009). Entre los ATCs, la amitriptilina (25-150mg/día) es la más prescrita y estudiada en clínica, con eficacia demostrada en la neuropatía diabética, neuralgia postherpética y en el dolor central (Saarto & Wiffen, 2007). Alivia componentes específicos en el dolor neuropático como la alodinia mecánica, el dolor constante o el dolor punzante. A diferencia de los analgésicos clásicos, el efecto de los antidepresivos en dolor neuropático se observa después de un tratamiento prolongado (Sindrup et al., 2005), sugiriendo su implicación en eventos de plasticidad neuronal, cambios que podrían impactar en los cambios en la plasticidad que acompañan al dolor neuropático (Costigan et al., 2009; Nardone et al., 2013).

En general, en los ATCs el número de pacientes que hay que tratar para obtener al menos un alivio moderado del dolor, conocido como *Number-Needed-to-Treat* (NNT), es 3.6 mientras que el número necesario para causar daño (*Number-Needed-to-Harm*, NNH) calculado por síntomas como somnolencia, mareo, náusea, sudor, dolor de cabeza, visión borrosa, palpitaciones, irritabilidad o ataxia es 6. Las principales ventajas de los ATCs son su bajo coste, la dosificación única diaria y que además presentan efectos beneficiosos en la depresión, enfermedad que puede cursarse en paralelo en pacientes que sufren dolor neuropático. Sin embargo, los ATCs están contraindicados en pacientes con problemas cardíacos, glaucoma y disuria, debido a sus propiedades anticolinérgicas.

Los antidepresivos tricíclicos pueden actuar sobre los canales de sodio voltaje-dependientes, propiedad compartida con los anestésicos locales. De hecho, la amitriptilina produce una acción anestésica aplicada en el nervio ciático en rata.

Sin embargo, el interés en los ATCs como anestésicos locales es limitado debido a su neurotoxicidad y a que puede provocar daño axonal y degeneración walleriana. En humanos, una aplicación local de amitriptilina produce analgesia cutánea en pacientes sanos, pero ésta se acompaña de enrojecimiento, picazón y sensación de quemazón. En pacientes con dolor neuropático, la aplicación de amitriptilina 2-5% provoca enrojecimiento y no es mucho más efectiva que el placebo (Ho et al., 2008). Conjuntamente, estos datos no favorecen el uso de ATCs de forma tópica en el contexto de dolor neuropático. Mecanísticamente, sin embargo, la acción de los ATCs en los canales de sodio puede contribuir activamente a su acción terapéutica a dosis clínicas.

Los **inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina/noradrenalina** como la duloxetina (60–120 mg/día) o venlafaxina (150–225 mg/día) son otro de los tratamientos de primera línea recomendados para aliviar el dolor neuropático. Tanto la duloxetina como la venlafaxina son prescritas para tratar la polineuropatía diabética y el grupo NeuPISG recomienda la duloxetina como tratamiento de primera línea para tratar condiciones de dolor neuropático (Finnerup et al., 2015). Los IRSNs actúan inhibiendo la recaptación de la serotonina y noradrenalina, incrementando su función en las vías descendentes moduladoras. De acuerdo a resultados clínicos, estos compuestos tienen eficacia demostrada en el tratamiento de varias condiciones de dolor neuropático periférico y central como la polineuropatía dolorosa. El número NNT es de 6.4 mientras que el NNH es de 11.8. Los IRNS presentan menos efectos adversos que los ATCs, al tener menor afinidad por los receptores histamínicos, muscarínicos, de glutamato y GABA (Vranken, 2009). Entre los efectos adversos más comunes de los IRNS se incluyen náuseas, boca seca, dolor de cabeza, descenso del lívido, mareo, somnolencia o insomnio, apetito reducido e hipertensión. En general son más seguros que los ATCs, pero el uso de la duloxetina está contraindicado en pacientes con insuficiencia renal o hepática y el uso de la venlafaxina en pacientes con hipertensión.

El tercer grupo de fármacos recomendados como tratamiento de primera línea son los **gabapentinoides**. El uso de fármacos antiepilépticos para tratar el dolor neuropático se basa en la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal por estos compuestos, un proceso clave en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (Vranken, 2009). Los agentes anticonvulsivos actúan a través de

diferentes mecanismos bloqueando canales de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando los efectos inhibitorios de GABA, o inhibiendo la transmisión sináptica excitatoria glutamatérgica (Bialer, 2012). Concretamente, la **gabapentina** y **pregabalina** son dos de los fármacos más utilizados en el tratamiento del dolor neuropático en la actualidad, a pesar de que su mecanismo molecular no se conoce con exactitud. Estos dos fármacos son ligandos de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y 2 de los canales de calcio voltaje-dependientes. Globalmente presentan un perfil de efectos adversos favorable, siendo sus efectos adversos más comunes mareos, somnolencia, edema periférico, dolor de cabeza, boca seca, ganancia de peso y astenia (Dworkin et al., 2007). La gabapentina fue desarrollada como un agente anticonvulsivo y está aprobada por la FDA para tratar el dolor neuropático postherpético. El valor NNT para la gabapentina es de 6.3 y el valor NNH es 25.6. La gabapentina es generalmente un fármaco bastante seguro y no tiene interacciones importantes con otros fármacos, siendo sus principales efectos adversos la somnolencia y el mareo. En pacientes mayores también puede causar o exacerbar deterioros cognitivos. La dosis efectiva está entre 1200 y 3600mg/día repartida en tres dosis, a la que se llega de forma gradual en varias semanas. El inicio de la actividad analgésica se consigue con retraso cuando se llega a la dosis terapéutica. De forma similar a la gabapentina, la **pregabalina** está aprobada por la FDA para tratar el dolor neuropático postherpético y diabético. Presenta una eficacia y tolerancia bien establecida (Derry et al., 2019) similar a la de la gabapentina, con un efecto dosis-respuesta más pronunciado. El valor NNT es 7.7 y el valor NNH es 13.9. Además, el inicio del alivio del dolor ocurre antes con la pregabalina que con la gabapentina y se ha demostrado que una dosis de 150mg/día ya es efectiva (Dworkin et al., 2007); observándose los beneficios más notables a partir de las dos semanas de tratamiento a dosis de entre 300-600mg/día.

En Estados Unidos la pregabalina está aprobada como tratamiento adjunto para enfermedades convulsivas en adultos y para tratar el dolor asociado con neuropatía diabética periférica, neuralgia postherpética, fibromialgia y dolor neuropático asociado con una lesión de la médula espinal ([http://labeling.pfizer.com/Show\\_labeling.aspx?id=561](http://labeling.pfizer.com/Show_labeling.aspx?id=561)). En la Unión Europea está aprobada para tratar dolor neuropático central y periférico, desorden de ansiedad generalizado y como terapia adjunta para tratar la epilepsia (<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/14651/SPC/>) (Tabla 5).

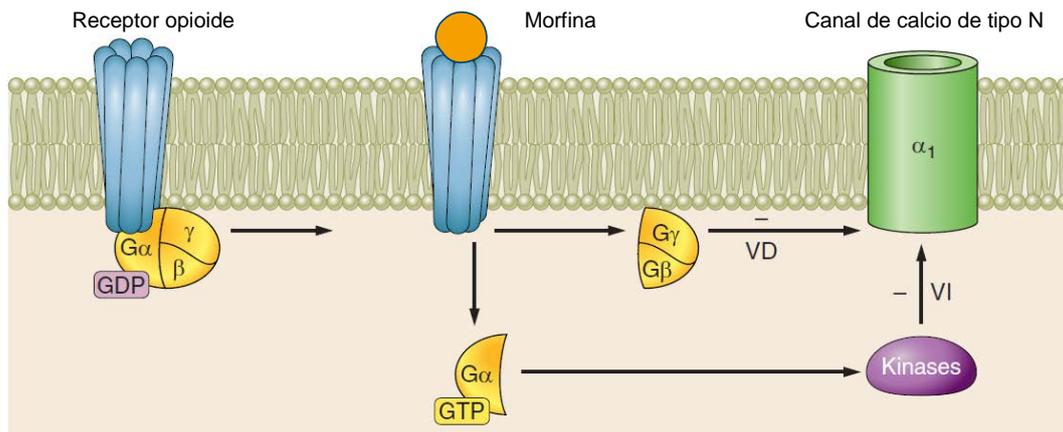
Indicación	Dosis	Dosis máxima
Dolor neuropático asociado con neuropatía diabética periférica	3 dosis divididas por día	300mg/día dentro de 1 semana
Neuralgia postherpética	2 o 3 dosis divididas por día	300mg/día dentro de 1 semana. Dosis máxima 600mg/día
Tratamiento adjunto para convulsiones parciales	2 o 3 dosis divididas por día	Dosis máxima 600mg/día
Fibromialgia	2 dosis divididas por día	300mg/día dentro de 1 semana. Dosis máxima 450mg/día
Dolor neuropático asociado con lesión una lesión medular	2 dosis divididas por día	300mg/día dentro de 1 semana. Dosis máxima 600mg/día

**Tabla 5.** Indicaciones y posología de la pregabalina.

#### 2.4.2 Tratamientos de segunda línea.

Los tratamientos de segunda línea contra el dolor neuropático incluyen el tramadol y los opioides, que de acuerdo a las pautas del grupo NeuPSIG deben reservarse a pacientes que no responden a los medicamentos de primera línea. Sin embargo, en algunos casos específicos como el dolor neuropático asociado al cáncer o en episodios exacerbados de dolor neuropático severo, estos fármacos son recomendados como tratamiento de primera línea (Dworkin et al., 2010).

El sistema opioide, a través de los receptores mu (MOP), delta (DOP) y kappa (KOP) tiene un papel crucial en el control inhibitorio del dolor (Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2002). Los **opioides** producen su efecto terapéutico a través de la interacción con sus receptores específicos mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) y kappa ( $\kappa$ ). En el contexto de la modulación del dolor, el receptor  $\mu$ -opioide es el más estudiado al ser la diana de la morfina, uno de los analgésicos más potentes. Estos receptores están acoplados a proteínas G inhibitorias que producen una disminución en la liberación de neurotransmisores (Al-Hasani & Bruchas, 2011) (Figura 8). El receptor  $\mu$ -opioide actúa activando los canales correctores del flujo de potasio dependientes de proteína G (GIRK) e inhibiendo los canales de calcio de tipo N presinápticos en las fibras aferentes primarias. Además, los opiodes pueden actuar directamente sobre la maquinaria de liberación de neurotransmisores. Como resultado final se produce una reducción de la excitabilidad en las neuronas postsinapticas del asta dorsal por la activación de GIRK y como consecuencia se produce analgesia.



**Figura 8. Inhibición de los canales de calcio tipo N por las proteínas G.** La activación del receptor opioide por su agonista (morfina) resulta en la unión de la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G a la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de calcio voltaje dependientes de tipo N. Esta unión media la inhibición voltaje-dependiente (VD) del canal, mientras que  $G\alpha$  media la modulación voltaje-independiente (VI) del canal de tipo N. Modificado de: Bourinet et al., 2014

Cabe remarcar que la reducción en la intensidad del dolor neuropático es significativamente mayor con tratamientos con dosis mayores de opioides respecto a tratamientos a dosis más bajas, sin embargo el uso de dosis elevadas produce más efectos adversos sin un beneficio adicional significativo en términos de medida de resultados (Rowbotham et al., 2003). Los principales efectos secundarios que producen los opioides son estreñimiento, náusea y sedación. Algunos de estos efectos (náusea y sedación) pueden disminuir con una titulación gradual del fármaco. Además, en pacientes mayores pueden producir deterioro cognitivo y dependencia física. Sin embargo, la mayor preocupación en el uso de opioides es el riesgo de mal uso, abuso o adicción en pacientes con dolor crónico, problemas que pueden darse entre un 5-50% de los pacientes.

En referencia al uso de opioides en estados de dolor, ha de considerarse un fenómeno denominado Hiperálgia Inducida por Opioides (HIO), que tiene lugar después de administrar opioides de forma crónica y resulta en un aumento de la sensibilidad a estímulos dolorosos. Este fenómeno podría estar relacionado con la tolerancia, que se corresponde con un descenso progresivo en la analgesia que produce una dosis de opioides cuando se administran de forma crónica, lo cual conlleva a un aumento en las dosis de opioides para que se mantenga el efecto inicial. Así, el tratamiento que se supone que tiene que aliviar el dolor del paciente, provoca en última instancia una exacerbación en la sensación del dolor (Roedel et al., 2016). Por otra parte, diferentes estudios avalan la implicación del sistema opioide en la acción de los antidepresivos en el dolor neuropático. Por ejemplo, la

naloxona (un antagonista del receptor opioide) bloquea el efecto de tratamientos repetidos o a largo plazo con antidepresivos en modelos animales de dolor neuropático (Benbouzid et al., 2008a; Üçel et al., 2015). Además, estudios utilizando ratones transgénicos deficientes para receptores opioides, han demostrado la implicación de los receptores DOP en la acción antialodínica del tratamiento a largo plazo con los ATCs (Benbouzid et al., 2008b; Choucair-Jaafar et al., 2014).

Otro de los fármacos recomendados como tratamiento de segunda línea es el **tramadol**. Al igual que los opioides, el tramadol se considera un fármaco de segunda línea excepto en circunstancias como el tratamiento de dolor neuropático agudo, de dolor neuropático asociado al cáncer o en episodios exacerbados de dolor severo (Attal et al., 2006). El tramadol es un agonista débil del receptor  $\mu$ -opioide que también actúa parcialmente inhibiendo la recaptación de noradrenalina y serotonina. Como la oxicodona (Eisenberg et al., 2006), el tramadol reduce el dolor en la polineuropatía diabética (Duehmke et al., 2006). Los efectos adversos más comunes del uso del tramadol incluyen mareos, náusea, estreñimiento, somnolencia y un incremento en el riesgo de convulsiones en pacientes con epilepsia. Además, asociado con otros fármacos serotoninérgicos (ej. antidepresivos o litio) existe el riesgo de producirse el síndrome serotoninérgico. El resultado de ensayos controlados aleatorios en pacientes con diferentes etiologías neuropáticas ha demostrado que el tramadol reduce el dolor y mejora algunos aspectos de la calidad de vida (Duehmke et al., 2017).

### **2.4.3. Tratamientos de tercera línea.**

Los tratamientos de tercera línea incluyen a los **cannabinoides**. De forma general el grupo NeuPSIG recomienda el uso de estos medicamentos en pacientes que no pueden tolerar o que no responden adecuadamente a los tratamientos de primera y segunda línea. Los cannabinoides son agentes analgésicos con evidencias crecientes de mostrar eficacia en estados de dolor neuropático central, con un valor NNT de 3.4 (Moulin et al., 2014). Por ejemplo, se ha visto que pueden ser eficaces tratando el dolor neuropático asociado a esclerosis múltiple, reduciendo el dolor y la espasticidad. El dronabinol produce analgesia modesta en un ensayo en el que se investigaba dolor central en esclerosis múltiple (Svendsen et al., 2004); mientras que una mezcla 50/50 de los dos principales componentes del cannabis, el

tetrahidrocannabinol y cannabidiol, también produjo un beneficio significativo en otro ensayo clínico investigando dolor central en esclerosis múltiple (Rog et al., 2005). Sin embargo, estos estudios son aún limitados y la eficacia de los cannabinoides es aun cuestionable. Desde 2006, ha habido siete estudios (clase I y II) investigando dolor neuropático, y todos excepto uno fueron positivos (Lynch et al., 2011). Cuatro de estos estudios implicaban el uso de cannabis fumado para el tratamiento de la neuropatía en VIH, para el tratamiento del dolor neuropático postraumático o postquirúrgico, y en estados de dolor neuropático combinado central y periférico. Otros dos ensayos implican el uso de sprays en la mucosa oral en el tratamiento de estados de dolor neuropático periférico con alodinia y neuropatía diabética. El único ensayo negativo comparaba la acción de nabilona, un cannabinoide sintético, con dihidrocodeína (un opioide) en condiciones de dolor neuropático periférico y se vio que la acción de la dihidrocodeína era superior a la nabilona (Toth et al., 2012).

#### **2.4.4 Tratamientos de cuarta línea.**

Entre los tratamientos de cuarta línea para tratar el dolor neuropático se incluyen agentes anticonvulsionantes, la metadona o la lidocaína tópica.

La **lacosamida** es un agente anticonvulsivo con propiedades bloqueantes sobre los canales de sodio voltaje dependientes. Su eficacia ha sido estudiada en varios ensayos sobre neuropatía diabética, observándose modestos beneficios con un rango del valor NNT de 10 a 12. Por ello, tiene una limitada eficacia para el tratamiento de la neuropatía diabética.

La **metadona** es un analgésico opioide sintético que podría ser útil para el tratamiento del dolor neuropático debido a sus propiedades antagonistas sobre el receptor NMDA. Tiene una biodisponibilidad oral excelente y una duración de acción de al menos 8h con dosis repetidas. Sin embargo, no existen ensayos que apoyen el uso de metadona en el tratamiento del dolor neuropático (Moulin et al., 2014).

El uso de la **lidocaína tópica**, bloqueante de los canales de sodio voltaje-dependientes, puede ser útil en el tratamiento del dolor neuropático. Su uso es eficaz en pacientes con dolor neuropático periférico, como es el caso de la neuralgia postherpética, y se mantiene como un fármaco de segunda línea para esta condición basado en tres ensayos positivos que investigaban el uso de un parche de lidocaína

al 5% en el tratamiento de la neuralgia postherpética. Sin embargo, otros ensayos han fallado en demostrar los beneficios de la crema o el parche de lidocaína 5%. Por ello, los resultados actuales sobre el uso de lidocaína tópica en el dolor neuropático son inconcluyentes.

El **tapentadol** es un fármaco similar al tramadol, con un mecanismo de acción dual como agonista del receptor  $\mu$ -opioide e inhibidor de la recaptación de la noradrenalina. Fue aprobado por la FDA en el año 2008 para el tratamiento de dolor agudo moderado a severo y para aliviar el dolor en polineuropatías diabéticas severas cuando los pacientes no responden a otros tratamientos. Su potencia es aproximadamente un quinto de la oxicodona y su mecanismo de acción es de interés. Sin embargo, aún no existen suficientes evidencias publicadas sobre su efectividad en condiciones de dolor neuropático y por ello las recomendaciones del grupo NeuPSIG sobre su uso son inconcluyentes (Finnerup et al., 2015).

La **capsaicina tópica** podría tener utilidad para tratar dolor neuropático localizado, como la neuralgia postherpética. Inicialmente produce un incremento en la sensibilidad de los nociceptores, seguido de una desensibilización persistente después de una aplicación repetida a bajas dosis (<1%) o de una única aplicación a una dosis elevada (8%), previa aplicación de un anestésico local debido a la intensa sensación de quemazón inicial que produce. En el tratamiento de la neuropatía dolorosa relacionada con el VIH y de la neuralgia postherpética, ha demostrado beneficios relativos significativos respecto a los controles hasta después de 12 semanas con una única aplicación (Moulin, 2014).

El uso de la **toxina botulínica** en ensayos relacionados con dolor neuropático ha reportado una reducción significativa en la intensidad del dolor hasta las 12-14 semanas en dos ensayos, pero el tamaño muestral de los mismos era pequeño. Por tanto las evidencias para el uso de la toxina botulínica en el tratamiento del dolor neuropático son aún preliminares (Moulin, 2014).

Fármaco	Diana	Estatus
Gabapentinoides (pregabalina, gabapentina)	Subunidad auxiliar $\alpha 2\delta$ -1 canales $Ca^{2+}$ voltaje dependientes	Tratamiento primera línea (Finnerup, 2015)
Antidepresivos tricíclicos (amitriptilina)	Sistemas recaptación NA, serotonina	Tratamiento primera línea (Finnerup, 2015)
Inhibidores de la recaptación NA/serotonina (duloxetina, venlafaxina)	Sistemas recaptación NA, serotonina	Tratamiento primera línea (Finnerup, 2015)
Tramadol	Receptores opioides y sistemas recaptación NA, serotonina	Tratamiento segunda línea (Moulin, 2014)
Liberación controlada opioides	Receptores opioides	Tratamiento segunda línea (Moulin, 2014)
Cannabionoides	Receptores CB1 y CB2	Tratamiento tercera línea (Moulin, 2014)
Toxina botulínica	Liberación neurotransmisores	Tratamiento cuarta línea (Moulin, 2014)
Metadona	Receptores opioides y NMDA	Tratamiento cuarta línea (Moulin, 2014)
Lamotrigina	Canales $Na^{+}$ voltaje dependientes, canales $Ca^{2+}$ voltaje dependientes tipo N, L y P	Tratamiento cuarta línea (Moulin, 2014)
Lacosamida	Inactivación lenta canales $Na^{+}$ voltaje dependientes	Tratamiento cuarta línea (Moulin, 2014)
Tapentadol	Receptor $\mu$ -opioides y sistema recaptación NA	Tratamiento cuarta línea (Moulin, 2014)
Carbamazepina	Canales $Na^{+}$ voltaje dependientes y receptores $GABA_A$	Uso restringido a neuralgia del trigémino (Demant, 2014)
<b>Ziconotide</b>	Canales $Ca^{2+}$ voltaje dependientes tipo N	Administración intratecal cuando otros tratamientos no responden (McGivern, 2007)
Ketamina	Receptores NMDA	Uso clínico no habitual (Niesters, 2014; Maher, 2017)
Parche de lidocaina	Canales $Na^{+}$ voltaje dependientes	En uso clínico (Finnerup, 2015)
Parche de capsaicina	Canales TRPV1	En uso clínico (Dworkin, 2007)

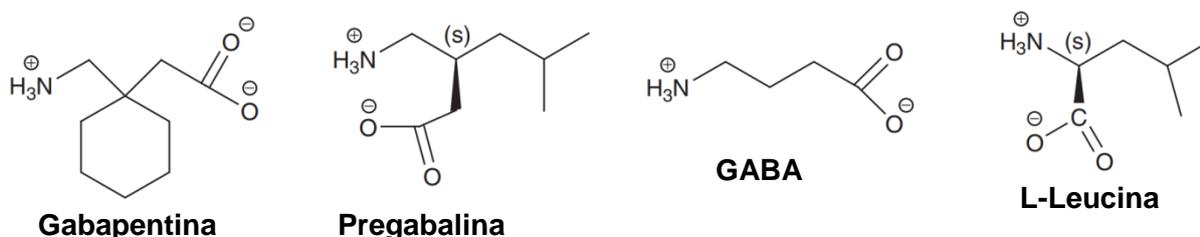
**Tabla 6. Tratamientos farmacológicos actuales contra el dolor neuropático.** Modificado de: Alles & Smith, 2018.

### 3. GABAPENTINOIDES Y LA SUBUNIDAD $\alpha 2\delta$ .

En la actualidad, los fármacos de la familia de los gabapentinoides son de los más prescritos para aliviar el dolor neuropático en enfermedades como la fibromialgia, la neuropatía diabética o la neuralgia del trigémino (Finnerup, 2015). Su uso extensivo contrasta, sin embargo, con el limitado conocimiento sobre las implicaciones funcionales que produce la interacción de los gabapentinoides con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y cuáles son sus efectos sobre la neurotransmisión.

### 3.1 Gabapentinoides prototípicos: Pregabalina y gabapentina.

Tanto la pregabalina como la gabapentina son compuestos aminoacídicos que se utilizan para prevenir las convulsiones parciales en la epilepsia y para tratar algunos tipos de dolor neuropático. La pregabalina y la gabapentina son ligandos específicos de la subunidad auxiliar  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio voltaje-dependientes, subunidad que se expresa fundamentalmente en los terminales presinápticos de las neuronas de la médula espinal y del cerebro. A pesar de su similitud estructural con el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la pregabalina y la gabapentina no se unen a los receptores GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub> (Li et al, 2011) ni afectan a la recaptación, síntesis o metabolismo del GABA (Taylor, 2009). La importancia de la subunidad  $\alpha 2\delta$  para la acción de los gabapentinoides está descrita en múltiples estudios. Por ejemplo, utilizando ratones mutantes en los cuales se substituye el gen de  $\alpha 2\delta$ -1 por otro con una única mutación en un aminoácido (arginina en la posición 217 es substituida por alanina, R217- $\alpha 2\delta$ -1), la unión de los gabapentinoides a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se reduce y además se pierde la inhibición de la alodinia (Field et al, 2006). Por otra parte, estudios de actividad estructural también han demostrado que pregabalina y gabapentina se unen a las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2 en sistemas nativos y recombinantes humanos y porcinos, sugiriendo que los efectos clínicos de los gabapentinoides son debidos a su interacción con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2 de los canales de calcio voltaje-dependientes (Li et al, 2011). Por ello, a los gabapentinoides se les denomina ligandos  $\alpha 2\delta$ . Su afinidad es mayor por  $\alpha 2\delta$ -1 ( $K_d = 59\text{nM}$ ) comparado a  $\alpha 2\delta$ -2 ( $K_d = 153\text{nM}$ ) (Marais et al., 2001). Debido a que la purificación parcial de las subunidades  $\alpha 2\delta$  incrementa su afinidad aparente hacia la pregabalina (Davies et al., 2006), se ha sugerido que los gabapentinoides compiten por la unión de  $\alpha 2\delta$  con un ligando endógeno como podría ser la L-leucina, L-isoleucina o la valina (Hendrich et al., 2008; Alles & Smith, 2018).

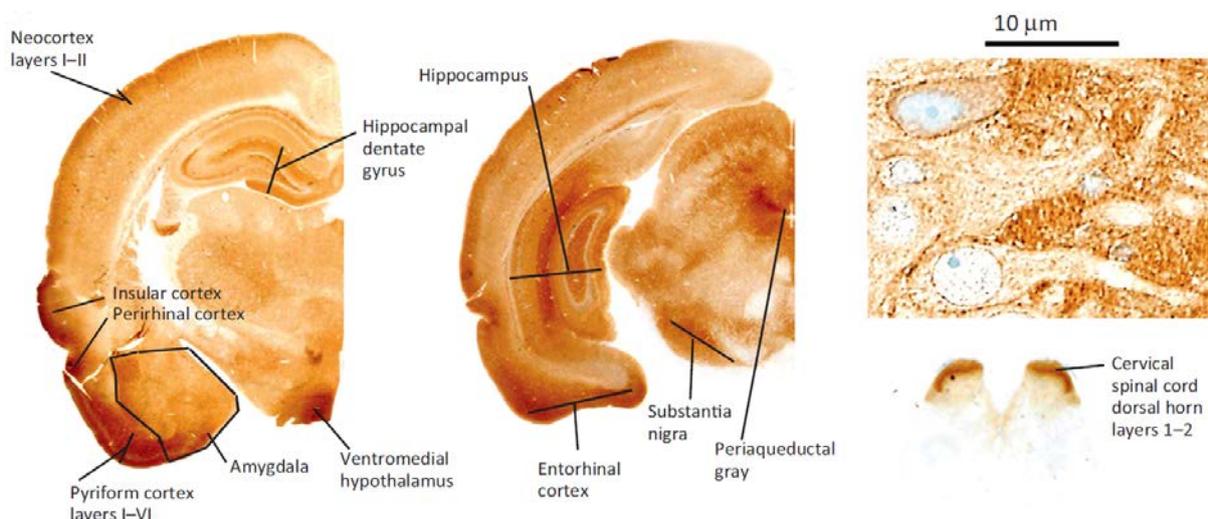


**Figura 9.** Estructuras químicas de la gabapentina, pregabalina, ácido gamma-aminobutírico y L-leucina.

### 3.2 Lugar de acción de los gabapentinoides.

En la actualidad, el único lugar molecular conocido donde se ejercen las acciones relevantes de la pregabalina y la gabapentina es la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y en menor medida  $\alpha 2\delta$ -2. A pesar de su similitud química con el GABA, la pregabalina y gabapentina no imitan la acción del GABA, no se unen a receptores GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub> (Lanneau et al., 2001) y no afectan a la recaptación, síntesis o metabolismo del GABA (Taylor, 2009). Es posible que puedan existir otros sitios de acción aún no descubiertos, pero las evidencias actuales sugieren que únicamente los sitios de unión a  $\alpha 2\delta$  son relevantes para la actividad funcional de estos compuestos. La afinidad de unión de la pregabalina y la gabapentina a las proteínas  $\alpha 2\delta$  ( $K_d$ ) es del orden nanomolar, mientras que las acciones fisiológicas de estos fármacos están normalmente en un rango micromolar. Una razón probable para que se de esta discrepancia es que los ligandos endógenos de  $\alpha 2\delta$  en tejidos vivos (ej. L-leucina, L-Isoleucina, L-valina) están presentes a concentraciones micromolares y éstos han de ser desplazados del receptor por los fármacos (Stahl et al., 2013).

En el SNC de rata, la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se expresa abundantemente en los terminales de las neuronas sensoriales primarias en el asta dorsal de la médula espinal, en los terminales glutamatérgicos de las fibras musgosas hipocampales y en las capas I y II del neocórtex, especialmente en las áreas insular, entorrinal, peririnal y piriforme. Otras áreas con alta densidad en  $\alpha 2\delta$ -1 incluyen el bulbo olfatorio, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, el núcleo accumbens y la sustancia nigra (Taylor et al., 2008).

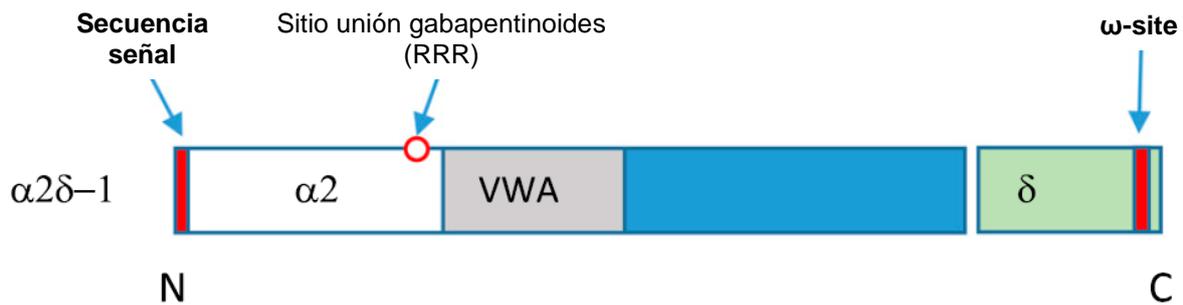


**Figura 10. Áreas anatómicas en el cerebro de rata con una expresión elevada de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1.** Se asume que las áreas marcadas densamente para la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 (tinción marrón) coinciden con los sitios de acción del fármaco. Modificado de: Taylor et al., 2008.

### 3.3 Papel de $\alpha 2\delta$ como receptor de los gabapentinoides: isoformas, estructura y distribución tisular.

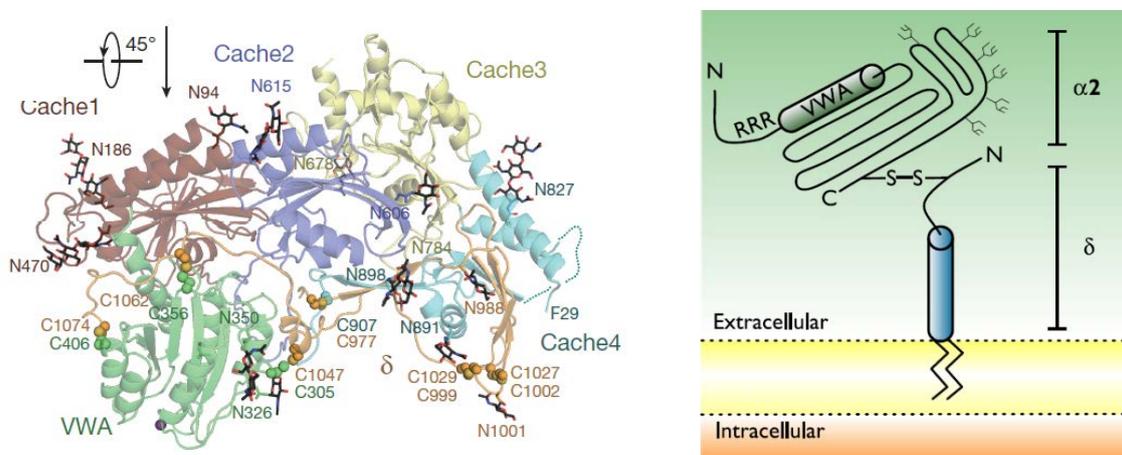
Existen cuatro isoformas conocidas de la subunidad  $\alpha 2\delta$ :  $\alpha 2\delta$ -1,  $\alpha 2\delta$ -2,  $\alpha 2\delta$ -3 y  $\alpha 2\delta$ -4. Estas subunidades están codificadas por uno de los cuatro genes de mamíferos, *CACNA2D1*, 2, 3 y 4. A pesar de que la subunidad  $\alpha 2\delta$  es codificada por un único gen, se expresa como dos proteínas ( $\alpha 2$  y  $\delta$ ), que posteriormente se reensamblan y asocian con la subunidad formadora del poro  $\alpha 1$  de los canales de calcio voltaje-dependientes (VGCCs) (Dolphin, 2013, 2016).

Todas las isoformas tienen una estructura similar, con una secuencia señal en la parte N-terminal del polipéptido que guía a  $\alpha 2\delta$  hacia el lumen del retículo endoplasmático. Una vez transportada a la membrana se expresa extracelularmente. La secuencia proteica de todas las isoformas de  $\alpha 2\delta$  tiene un dominio denominado “*Von Willebrand Factor A*” (VWA), dominio implicado en las interacciones proteína-proteína, dependiente de cationes divalentes. Un motivo clave en este dominio es el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos, denominado motivo MIDAS, que participa en la coordinación de los cationes divalentes (frecuentemente  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ) mediante un anillo de hasta cinco residuos polares o cargados (Whittaker & Hynes, 2002). Si el motivo MIDAS está intacto y tiene la totalidad de los cinco residuos polares o cargados, es muy probable que esté implicado en las interacciones proteína-proteína (Whittaker & Hynes, 2002) y éste es el caso de  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2, mientras que a  $\alpha 2\delta$ -3 y  $\alpha 2\delta$ -4 les falta un residuo polar en el motivo MIDAS (Canti et al., 2005). También hay otra región en las subunidades  $\alpha 2\delta$  que contiene los denominados dominios “*Cache*”, dominios extracelulares implicados en el reconocimiento de pequeñas moléculas. La obtención de la estructura por microscopía crioelectrónica de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 ha identificado un total de cuatro dominios “*Cache*”, uno de ellos localizado N-terminal al dominio VWA (Wu et al., 2016). Este dominio Cache contiene una repetición de argininas triple (RRR) que es fundamental para la unión de la pregabalina y la gabapentina (Field et al., 2006).



**Figura 11. Principales dominios en las subunidades  $\alpha 2\delta$ .** En la imagen se muestra la localización aproximada del dominio “Von Willebrand Factor A” (VWA), implicado en interacciones proteína-proteína y de la repetición triple de argininas (RRR), motivo fundamental para la unión de los gabapentinoides. Modificado de: Dolphin, 2016.

La naturaleza del pequeño dominio hidrofóbico en la parte C-terminal de las subunidades  $\alpha 2\delta$  predice que éstas son proteínas con anclaje-glicosilfosfatidilinositol (GPI)\*. En parte porque el dominio hidrofóbico C-terminal es muy corto y está presente en el extremo C-terminal, como por la presencia de un posible motivo de anclaje-GPI (CGG,  $\omega$ -site) en las subunidades  $\alpha 2\delta$ -3 y 4 (Dolphin, 2016). Los genes para todas las subunidades  $\alpha 2\delta$  codifican una única proteína precursora, que es procesada post-translacionalmente en dos polipéptidos ( $\alpha 2$  y  $\delta$ ), que se unen a través de puentes disulfuro.



**Figura 12. Topología de las subunidades  $\alpha 2\delta$ .** Todas las subunidades son productos de un único gen que es cortado post-translacionalmente en dos polipéptidos ( $\alpha 2$  y  $\delta$ ) que se unen por puentes disulfuro. La subunidad  $\delta$  está anclada a la membrana plasmática a través de un anclaje-GPI. Se enseña la posición aproximada del dominio von Willebrand factor A. \*Los anclajes-GPI están constituidos por glicolípidos que se unen a la parte C-terminal de algunas proteínas hidrófilas durante su maduración postraduccional. A través de este tipo de anclaje las proteínas se localizan en el lado extracelular de la membrana. Imagen izquierda de: Wu et al., 2016. Imagen derecha de: Patel & Dickenson, 2016.

La distribución de las subunidades  $\alpha 2\delta$  es ubicua (Tabla 6). Mientras que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se expresa en músculo esquelético, cardíaco y liso, así como en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y tejidos endocrinos, la subunidad  $\alpha 2\delta$ -2 se expresa predominantemente en el SNC, especialmente en el

cerebelo. La subunidad  $\alpha 2\delta$ -3 se expresa en el SNC, mientras que  $\alpha 2\delta$ -4 se expresa mayoritariamente en la retina y en tejidos endocrinos (Dolphin, 2013). El mRNA de  $\alpha 2\delta$ -1 se encuentra en muchos tipos de células neuronales en el SNC y en el sistema nervioso periférico, incluyendo las neuronas del DRG. El transcrito de  $\alpha 2\delta$ -1 colocaliza preferentemente con neuronas excitatorias mientras que el mRNA de  $\alpha 2\delta$ -2 colocaliza con neuronas inhibitorias GABAérgicas (Cole et al., 2005). Esta observación es respaldada por estudios que muestran que una sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$ -1 aumenta la transmisión sináptica excitatoria en neuronas de la médula espinal sin afectar a la transmisión sináptica inhibitoria (Zhou & Luo, 2015).

Gen	Proteína	Lugar expresión	Patologías asociadas con la disrupción del gen
<i>CACNA2D1</i>	$\alpha 2\delta$ -1	Músculo esquelético, cardíaco y liso. SNC, SNP y tejidos endocrinos	Disfunción cardíaca, disrupción del dolor neuropático
<i>CACNA2D2</i>	$\alpha 2\delta$ -2	SNC, especialmente cerebelo	Epilepsia, ataxia cerebelar
<i>CACNA2D3</i>	$\alpha 2\delta$ -3	SNC, SNP	Procesamiento central del dolor
<i>CACNA2D4</i>	$\alpha 2\delta$ -4	Retina, tejido endocrino	Distrofia retinal, ceguera nocturna

**Tabla 7. Resumen de las subunidades  $\alpha 2\delta$ .** Modificado de: Dolphin, 2013

### 3.4 Funciones fisiológicas de la subunidad $\alpha 2\delta$ -1.

#### 3.4.1 Implicación de $\alpha 2\delta$ -1 en el dolor neuropático.

La implicación de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en el dolor neuropático se ha caracterizado a lo largo de los últimos años a través de múltiples estudios que muestran que hay un aumento en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 tras producirse una lesión nerviosa, en estudios donde se ha modificado genéticamente su expresión aumentándola y en estudios donde se ha eliminado el gen de  $\alpha 2\delta$ -1.

Después de que se produzca una lesión en un nervio, las alteraciones transcripcionales que suceden son consideradas como una respuesta adaptativa para preservar la función neuronal. La lesión de una neurona sensorial provoca cambios en la transcripción de muchos genes que contribuyen a los procesos de hiperexcitabilidad y plasticidad neuronal observados en el dolor neuropático (Woolf, 2011). Entre el gran número de genes cuya expresión se ve alterada después de la lesión de un nervio, numerosos estudios han mostrado una elevación consistente en el mRNA de  $\alpha 2\delta$ -1 (Newton et al., 2001; Xiao et al., 2002; Bauer et al., 2009; Perkins et al., 2014); produciéndose un incremento equivalente en la expresión de la

proteína  $\alpha 2\delta$ -1 en varios modelos de dolor neuropático (Luo et al., 2001; Xiao et al., 2002; Boroujerdi et al., 2008; Bauer et al., 2009). Por el contrario, no se han descrito cambios en la expresión del resto de subunidades  $\alpha 2\delta$  ( $\alpha 2\delta$ -2, -3 y -4) después de inducirse dolor neuropático. Por ejemplo, un estudio muestra que después de la ligadura del nervio L5 en rata se produce un incremento en la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 17 veces mayor en los nervios ipsilaterales L5/L6 del ganglio de la raíz dorsal (Luo et al., 2001). Este incremento se detecta rápidamente después de la ligadura del nervio, llega a su pico máximo a los siete días después de la lesión y va disminuyendo a lo largo del tiempo hasta después de varios meses de haberse producido la lesión, hecho que correlaciona temporalmente con la aparición y desaparición de la alodina mecánica en el modelo utilizado de dolor neuropático (Luo et al., 2001). Otro estudio que utiliza el mismo modelo de dolor, muestra que las descargas neuronales que se producen después de realizar la lesión del nervio, regulan la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en el asta dorsal de la médula espinal (Boroujerdi et al., 2008). Boroujerdi y colaboradores encontraron que este hecho es crítico para el inicio del dolor neuropático y además demostraron que el uso de lidocaína tópica, bloqueaba la actividad neuronal ectópica inducida por la lesión y la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en la médula espinal y en el ganglio de la raíz dorsal. En otro estudio, también se ha observado un incremento en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en los terminales presinápticos de fibras aferentes primarias, en el asta dorsal de la médula espinal, tras producirse la ligadura del nervio (Bauer et al., 2009). En este estudio, tanto las fibras nociceptivas como las no-nociceptivas parecen contribuir a este incremento, ya que observaron un incremento en la expresión tanto en capas superficiales como en capas más profundas. Además, observaron que se producía una acumulación de  $\alpha 2\delta$ -1 proximal a la zona de la ligadura, indicativo de la existencia un transporte anterógrado. Por todo ello, los niveles de expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 parecen ser un factor clave conformando el inicio del dolor neuropático.

Para evaluar si efectivamente el aumento en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 puede ser causa del dolor neuropático, diversos estudios han utilizado como modelo de estudio ratones transgénicos que sobreexpresan esta subunidad. Los animales transgénicos que sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 desarrollan alodinia mecánica de forma natural, similar a la que exhiben los animales después de ligarles un nervio (Zhou & Luo, 2015). La alodinia mecánica sucede tras la sensibilización de las fibras A $\beta$  que

proyectan hacia las capas profundas de la médula espinal. La desregulación en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en la médula espinal contribuye a la sensibilización de estas neuronas, al incrementarse la transmisión sináptica excitatoria en las capas profundas de la médula espinal (Zhou & Luo, 2015). Los mismos autores demostraron también que niveles elevados de  $\alpha 2\delta$ -1 contribuyen a la sensibilización central a través de un mecanismo presináptico, al incrementarse la transmisión sináptica excitatoria en las neuronas de las capas superficiales de la médula espinal (Zhou & Luo, 2014). Concretamente, observaron un incremento en la frecuencia, pero no en la amplitud, de las corrientes excitatorias en miniatura (mEPSCs) en las neuronas de las capas superficiales de la médula espinal que sobreexpresan  $\alpha 2\delta$ -1.

Por otra parte, las observaciones descritas se relacionan con resultados obtenidos en animales *knockout* de  $\alpha 2\delta$ -1. Se ha observado que la supresión del gen  $\alpha 2\delta$ -1 en ratones ocasiona un retraso en el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica después de producirse la ligadura del nervio ciático (Patel et al., 2013), que además resulta en una reducción de la sensibilidad mecánica y térmica al frío. El retraso en el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica en los animales sin  $\alpha 2\delta$ -1, correlaciona también con la observación de que las neuronas sensoriales en estos animales  $\alpha 2\delta$ -1<sup>-/-</sup> generan menos potenciales de acción de forma continuada o repetitiva (Margas et al., 2016).

En resumen, el aumento en los niveles de expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 es un factor clave conformando el inicio del dolor neuropático, que se produce a través de la transmisión de la actividad periférica anormal desde las fibras aferentes primarias a las neuronas centrales (Boroujerdi et al., 2008). Además, la desregulación en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 contribuye a la sensibilización central (Zhou & Luo, 2014). Sin embargo, la ausencia de  $\alpha 2\delta$ -1 falla en prevenir la cronicidad y no es esencial en el mantenimiento del dolor neuropático (Patel et al., 2013).

### 3.4.2 Funciones moleculares de la subunidad $\alpha 2\delta$ -1.

La función más reconocida de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 es el control del **tráfico intracelular de los VGCCs a la membrana plasmática**. Sin embargo, para el estudio de esta función de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se han utilizado de manera rutinaria sistemas de expresión como las células tsA-201 o N2a y en la actualidad se cree que éste no es el único mecanismo de acción de las subunidades  $\alpha 2\delta$  (Dolphin,

2018). También se cree que  $\alpha 2\delta$ -1 puede influenciar las propiedades biofísicas de los VGCCs (Dolphin, 2016) y además se ha demostrado que su expresión determina la probabilidad de liberación de los neurotransmisores excitatorios (Hoppa et al., 2012), en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

De manera general, un aumento en la expresión de las subunidades  $\alpha 2\delta$  aumenta la expresión de las subunidades  $\alpha$  de los canales de calcio Cav1 (tipo L) y Cav2 (tipo N-P/Q-R) en la membrana plasmática, así como la densidad de las corrientes de calcio en sistemas de expresión heterólogos. El motivo MIDAS en el dominio VWA de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2 es el responsable de ambos efectos (Canti et al., 2005; Hoppa et al., 2012). En el caso del canal de calcio Cav1,  $\alpha 2\delta$ -1 interacciona con varios *loop* extracelulares en los dominios I-III (Wu et al., 2016). Además, un incremento en la expresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$  produce un aumento de las corrientes de calcio en los canales de calcio voltaje-dependientes Cav1 y Cav2. Las subunidades  $\alpha 2\delta$  incrementan la expresión (bien el número funcional de canales o bien la cantidad de proteína en la membrana plasmática) de varias combinaciones de los canales de calcio Cav1 (L) y Cav2 (N-P/Q-R) con subunidades  $\beta$ , en sistemas de expresión heterólogos (Dolphin, 2016). Varios estudios han demostrado que la subunidad  $\alpha 2\delta$  no altera la conductancia de estos canales (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002; Dolphin, 2016), por lo que el aumento en la corriente de calcio puede deberse a un incremento en la inserción de los canales de calcio Cav1 y Cav2 en la membrana plasmática y/o a un descenso en el reemplazamiento de los canales. Por ejemplo, se ha visto que  $\alpha 2\delta$ -1 aumenta la expresión en la superficie celular del canal Cav2.2 (tipo N) en varios sistemas de expresión (Hoppa et al., 2012; Cassidy et al., 2014). El motivo MIDAS, presente en el dominio VWA de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2, es el responsable del aumento de las corrientes de calcio (Canti et al., 2005; Hoppa et al., 2012) y de la expresión en la superficie del canal Cav2.2 (Hoppa et al., 2012; Cassidy et al., 2014). Mutaciones en este motivo cancelan la capacidad de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y  $\alpha 2\delta$ -2 de incrementar las corrientes de calcio. Sin embargo, mientras que el aumento en el tamaño de las corrientes es 10 veces mayor en células tsA-201 (Hoppa et al., 2012), el incremento en la expresión proteica en la superficie es menor a 2 veces en células N2a (Cassidy et al., 2014). Este hecho implica que la acción de  $\alpha 2\delta$  es célula-dependiente.

El incremento en el 'número funcional de canales' puede indicar un incremento en la cantidad de proteína de los canales en la membrana plasmática o un incremento en la proporción de canales que ya están en la membrana plasmática y que son capaces de responder a una despolarización. Algunos estudios han señalado que  $\alpha 2\delta$ -1 podría ayudar a incrementar la velocidad de inactivación del canal (Canti et al., 2005; Fuller-Bicer et al., 2009). Sin embargo, este efecto parece variar dependiendo de la combinación entre las diferentes subunidades  $\alpha 2\delta$ ,  $\alpha 1$  y  $\beta$  que se utilicen en el estudio (Dolphin, 2016). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el corte posttranslacional de  $\alpha 2\delta$ -1 en dos polipéptidos ( $\alpha 2$ -1y  $\delta$ ), que se unen después por puentes disulfuro, es un paso esencial para la activación dependiente de voltaje de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  en la membrana plasmática (Kadurin et al., 2016). Esta activación del canal sucede después de que se produzca el corte proteolítico de  $\alpha 2\delta$  en la superficie celular. Por lo tanto, esta acción es independiente de la función que pueda tener la subunidad  $\alpha 2\delta$  en el tráfico de los canales hacia la membrana celular. Este mecanismo podría mantener a los canales inmaduros en un estado inhibido, permitiendo el procesamiento posttranslacional de  $\alpha 2\delta$ -1 la activación voltaje-dependiente de los canales (Alles & Smith, 2018).

Además, se ha demostrado que las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1,  $\alpha 2\delta$ -2 y  $\alpha 2\delta$ -3 controlan directamente la **probabilidad de liberación de neurotransmisores** (Hoppa et al., 2012). Hoppa y colaboradores vieron en el mismo estudio que  $\alpha 2\delta$ -1 y 2 aumentan la expresión de los canales  $Ca_v2.1$  (P/Q) en sinapsis individuales. El estudio se realizó en neuronas hipocampales y muestra que la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$  produce un aumento en la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas en sinapsis individuales, postulando a la subunidad  $\alpha 2\delta$  como un organizador del acoplamiento de la entrada de calcio presináptico con la excitación. El proceso implica interacciones con el motivo MIDAS, que es fundamental para que se produzca este acoplamiento entre la entrada de calcio con la liberación de vesículas (Hoppa et al., 2012). Este mecanismo tiene especial relevancia para la acción de los gabapentinoides, ya que la capacidad de  $\alpha 2\delta$  para controlar la abundancia de canales de calcio dependientes de voltaje, no justifica completamente su habilidad controlando la liberación de neurotransmisores en las fibras aferentes primarias (Biggs et al., 2014).

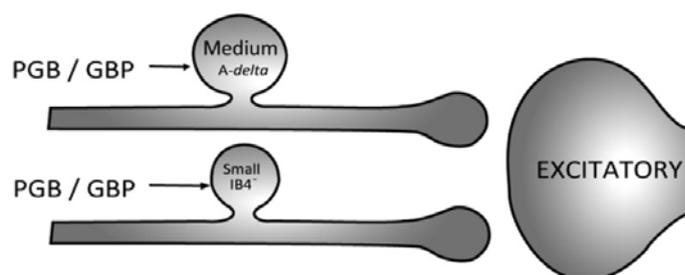
### 3.5 Mecanismo de acción de los gabapentinoides: Posibles escenarios.

El mecanismo de acción de los gabapentinoides tanto a nivel celular como después de producirse una neuropatía ha sido y es un tema muy debatido. En diferentes modelos animales de dolor neuropático, por ejemplo en el ratón generado con una mutación puntual en la arginina 217 de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y en el ratón *knockout* para  $\alpha 2\delta$ -1, se eliminan los efectos antinociceptivos de la pregabalina (Field et al., 2006; Patel et al., 2013). A **nivel sináptico** se cree que los gabapentinoides actúan inhibiendo la liberación de neurotransmisores, sin embargo el mecanismo molecular preciso por el cual ejercen su acción se desconoce (Patel & Dickenson, 2016). Las evidencias experimentales obtenidas hasta el momento muestran que los gabapentinoides actúan interfiriendo con las dos principales funciones de las subunidades  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio voltaje-dependientes presinápticos: el tráfico de los VGCCs a la membrana plasmática y la optimización de las propiedades biofísicas (Simms & Zamponi, 2012). Las sinapsis establecidas por las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en el asta dorsal de la médula espinal son la principal diana de los gabapentinoides, concretamente las subpoblaciones neuronales asociadas a fibras C y A $\delta$  (Biggs et al., 2014). La exposición crónica a los gabapentinoides interfiere selectivamente en el tráfico de los canales de tipo N hacia la membrana plasmática. Esta acción se cree que podría causar una reducción en la entrada de calcio presináptico cuando llega un potencial de acción y consecuentemente un descenso en la liberación de neurotransmisores nociceptivos (Hendrich et al., 2008; Hendrich et al., 2012).

No obstante, también hay evidencias que indican que los gabapentinoides actúan sobre canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N insertados en las sinapsis de forma aguda. Sin embargo, las observaciones obtenidas hasta la fecha en este sentido son contradictorias. Tanto la gabapentina como la pregabalina parecen ser inefectivas en la transmisión sináptica en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Hendrich et al., 2008; Hendrich et al., 2012). De manera similar, la gabapentina no inhibe de forma consistente la liberación de neurotransmisores en experimentos hechos en rodajas de tejido neuronal (Fink et al., 2000; Fehrenbacher et al., 2003; Brown & Randall 2005; Quintero et al., 2011). Sin embargo, la gabapentina sí reduce la liberación de neurotransmisores bajo previa inducción de hiperalgesia (Patel et al., 2000). Además, se ha visto que la aplicación aguda de

pregabalina disminuye la transmisión sináptica en cálices de Held (Di Guilmi et al., 2011) y reduce la liberación de vesículas sinápticas en cultivos de neuronas hipocámpales (Micheva et al., 2006).

Los gabapentinoides ejercen su acción preferentemente sobre neuronas con núcleos de tamaño medio y fibras tipo A $\delta$  y sobre neuronas con núcleos de tamaño pequeño IB4 $^-$  y fibras tipo C peptidérgicas (Biggs et al., 2014). Las explicaciones para esta selectividad sobre algunos tipos neuronales concretos puede deberse a la falta del transportador de aminoácidos neutros en las neuronas IB4 $^+$ . Otra posibilidad para explicar esta selectividad puede surgir por las diferencias en las propiedades de las subunidades  $\alpha 2\delta$  entre diferentes tipos neuronales. De hecho se han encontrado dos variantes de las subunidades  $\alpha 2\delta$  en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata (Lana et al., 2013). La principal variante se denomina  $\alpha 2\delta$ -1  $\Delta$ A+B-C y es la misma variante que se localiza en el cerebro, mientras que una segunda variante denominada  $\alpha 2\delta$ -1  $\Delta$ A+B $\Delta$ C está sobrerregulada en subpoblaciones neuronales del DRG, en neuronas pequeñas no mielinizadas de tipo C (Lana et al., 2013).

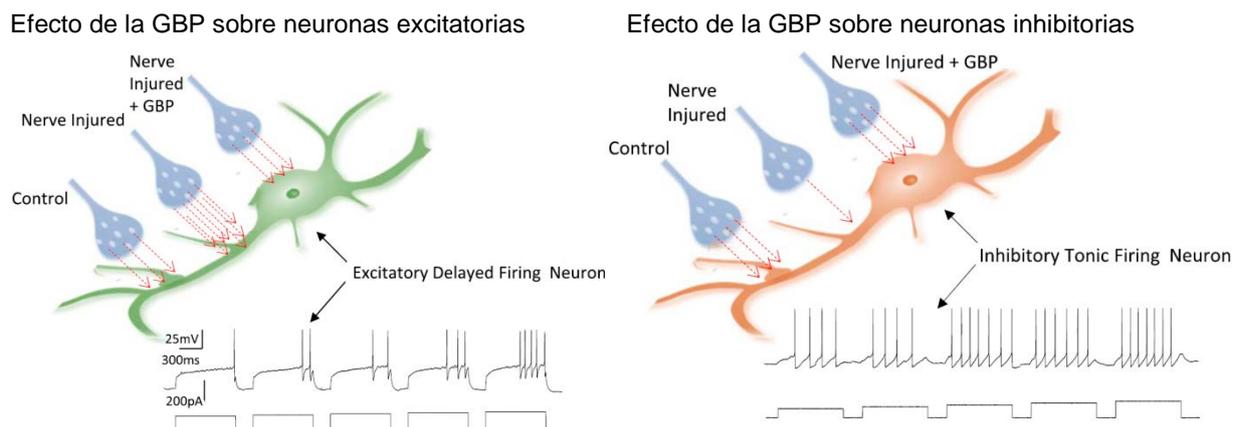


**Figura 13. Subpoblaciones neuronales del ganglio de la raíz dorsal sobre las que la pregabalina ejerce su acción.** La pregabalina ejerce su acción preferencial sobre neuronas con núcleos de tamaño medio y fibras tipo A $\delta$  y en neuronas con núcleos de tamaño pequeño IB4 $^-$  y fibras tipo C, que proyectan hacia neuronas excitatorias de la sustancia gelatinosa. Modificado de: Biggs et al., 2014.

En sistemas de expresión heterólogos y en los cuerpos celulares del ganglio de la raíz dorsal, la interacción de los gabapentinoides con  $\alpha 2\delta$  impide el tráfico de la subunidad formadora del poro de los VGCCs a la membrana celular (Cassidy et al., 2014; Hendrich et al., 2012; Hendrich et al., 2008; Tran-VanMinh & Dolphin 2010). Sin embargo, los gabapentinoides no parecen prevenir la inserción de las subunidades  $\alpha 1$  de los VGCCs en los terminales nerviosos, al menos en neuronas hipocámpales (Hoppa et al., 2012). En consecuencia, el mecanismo de acción de los gabapentinoides no se explica únicamente debido a que ejerzan una acción impidiendo el tráfico de los VGCCs a la membrana celular, hecho que sugiere la importancia de la acción directa de los gabapentinoides sobre las sinapsis. Biggs y colaboradores demostraron que la pregabalina bloquea la transmisión sináptica en neuronas del asta dorsal de la médula espinal y que la reducción en la liberación de

neurotransmisores en presencia de la pregabalina no es debida a una alteración del canal de calcio o a una reducción importante de la entrada de calcio en los terminales nerviosos presinápticos (Biggs et al., 2014). En este caso, la reducción en la liberación de neurotransmisores implica un mecanismo diferente. Una posibilidad es que la unión de los gabapentinoides a las subunidades  $\alpha 2\delta$  interrumpa la interacción entre las subunidades de los canales de calcio, con los sitios de liberación de neurotransmisores (Hoppa et al., 2012), pero es necesario aportar más evidencias sobre una acción directa en las sinapsis.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la lesión de un nervio periférico incrementa la transmisión sináptica excitatoria entre las fibras aferentes primarias y las neuronas excitatorias de la sustancia gelatinosa (Balasubramanyan et al., 2006). Estas neuronas presentan patrones de disparo específicos en respuesta a corrientes despolarizantes. El tratamiento agudo con gabapentina restaura la transmisión sináptica en animales lesionados a niveles previos a la lesión (Alles et al., 2017). Por otra parte, también se ha observado que la gabapentina parece incrementar la transmisión sináptica excitatoria hacia las neuronas inhibitorias, las cuales presentan un patrón de disparo tónico característico (Biggs et al., 2014; Alles et al., 2017). Por lo tanto, como consecuencia de la aplicación en agudo de los gabapentinoides se hipotetiza que se produce un descenso en la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal.



**Figura 14. Efecto de los gabapentinoides sobre las neuronas excitatorias e inhibitorias de la médula espinal.** La gabapentina revierte el incremento en la transmisión sináptica excitatoria en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, tras producirse una lesión. Por otra parte, también se ha observado una disminución en la transmisión sináptica inhibitoria en modelos animales de dolor neuropático, que la gabapentina también revierte. Modificado de: Alles & Smith, 2018.

Además de las acciones de los gabapentinoides sobre neuronas en la médula espinal, los mecanismos supraespinales contribuyen con claridad a sus efectos terapéuticos. Por ejemplo, la gabapentina administrada sistémicamente (100mg/kg) inhibe las vías serotoninérgicas pronociceptivas descendientes desde el cerebro a la médula espinal en ratas neuropáticas (Suzuki et al., 2005). En un estudio de imagen por resonancia magnética funcional, la gabapentina administrada de forma aguda (100mg/kg) mostró evocar cambios en múltiples regiones nociceptivas del cerebro, como por ejemplo la sustancia gris periaqueductal y el tálamo (Governo et al., 2008). Además, recientemente se ha demostrado que la gabapentina reduce la hiperexcitabilidad en el córtex somatosensorial inmediatamente después de su inyección en ratas 'neuropáticas' (Alles et al., 2017).

Sistema neurotransmisor	Región anatómica	Efecto máximo tratamiento	Concentración	Referencias
NA <sup>3</sup> H-noradrenalina	Rodajas de neocortex en rata (estimulación eléctrica, alto K <sup>+</sup> )	Reducción liberación ~20% con gabapentina y pregabalina	IC <sub>50</sub> = 10-12µM	Dooley et al. (2000a)
Glutamato ( <sup>3</sup> H-glutamato)	Rodajas núcleo trigeminal en rata (alto K <sup>+</sup> y pre-tratamiento con SP)	Reducción liberación ~35% con gabapentina y pregabalina	IC <sub>50</sub> = 6.5µM	Maneuf et al. (2001)
Glutamato (HPLC)	Rodajas de neocortex en rata (estimulación alto K <sup>+</sup> )	Reducción liberación ~12-25% con gabapentina y pregabalina	100µM (única concentración probada)	Dooley et al. (2000b)
Glutamato (potenciales sinápticos)	Rodajas de hipocampo en rata (estimulación eléctrica)	Potenciales acción reducidos un 10% con gabapentina	10µM (única concentración probada)	Brown y Randall (2005)
Glutamato y glicina (corrientes sinápticas)	Rodajas médula espinal en rata (estimulación eléctrica)	Corrientes sinápticas reducidas un 45%	IC <sub>50</sub> = 0.05µM	Bayer et al. (2004)
Glutamato y GABA (corrientes sinápticas)	Rodajas de hipocampo en rata (estimulación eléctrica)	Corrientes sinápticas reducidas un 30%	300 µM IC <sub>50</sub> = 100µM	Van Hooff et al. (2002)
Glutamato (mEPSCs)	Rodajas córtex entorrinal en rata	Reducción en los mEPSCs del 60% con gabapentina y pregabalina	IC <sub>50</sub> = 10µM	Cunningham et al. (2004)
Glutamato ( <sup>3</sup> H-glutamato)	Rodajas núcleo trigeminal en un modelo de neuropatía diabética (SZT) en rata. Estimulación alto K <sup>+</sup> y pre-tratamiento con SP.	Reducción liberación ~24% con gabapentina	30 µM	Maneuf et al. (2004)
Glutamato y GABA (marcador liberación vesículas FM4-64)	Cultivos primarios hipocampales en rata	Reducción liberación 9.5%	100 µM (única concentración probada)	Micheva et al. (2006)
Substancia P y CGRP (inmunoensayo)	Rodajas de médula espinal en rata (previa inflamación)	Reducción liberación 60-70% con gabapentina y pregabalina	10 y 100µM	Fehrenbacher et al. (2003)
Acetilcolina	Músculo soleo en ratón (estimulación nervio)	Contracciones reducidas un 30% con pregabalina	100 µM IC <sub>50</sub> = 10µM	Joshi & Taylor (2006)
<sup>3</sup> H-noradrenalina <sup>3</sup> H-acetilcolina <sup>3</sup> H-serotonina	Rodajas de neocórtex humano (estimulación alto K <sup>+</sup> )	Reducción liberación entre 22% y 56% con gabapentina y pregabalina	100 µM	Brawek et al. (2008)
<sup>3</sup> H-GABA <sup>3</sup> H-Glutamato	Sinaptosomas de neocórtex humano (estimulación alto K <sup>+</sup> )	Reducción liberación GABA 39% y 47% con gabapentina y pregabalina	100 µM	Brawek et al. (2009)

Glutamato	Microdiálisis <i>in vivo</i> en la médula espinal de rata (naïve y neuropáticas)	Reducción liberación en ratas neuropáticas	100mg/kg	Kumar et al. (2010)
Glutamato (corrientes sinápticas en cálices de Held)	Rodajas de mesencéfalo	Reducción EPSCs 30%	500µM y 1mM	Di Guilmi et al. (2011)
Glutamato	Rodajas de neocórtex en rata (estimulación alto K <sup>+</sup> )	Reducción liberación 46-78% con gabapentina y pregabalina respectivamente a 100µM	0.1-100 µM IC <sub>50</sub> = 5.3µM	Quintero et al. (2011)
Neuronas excitatorias (delay/transient neurons)	<i>Ex vivo</i> recordings en neuronas de <i>substancia gelatinosa</i> (estimulación alto K <sup>+</sup> ) Cortex somatosensorial ( <i>two-photon imaging</i> )	Reducción amplitud sEPSCs/mEPSCs Reducción excitabilidad cortical 56% con gabapentina	100mg/kg	Alles et al. (2017)

**Tabla 8.** Acción de los gabapentinoides en la modulación de la liberación de neurotransmisores.

### 3.6 Efectividad de los gabapentinoides.

En modelos animales de dolor neuropático cada rata o ratón responde a las acciones antialodínicas de los gabapentinoides (Kimura et al., 2016). Sin embargo, este hecho difiere bastante de la eficacia clínica de los gabapentinoides, donde sólo un 35% de los pacientes reporta alivio del dolor (Wiffen et al., 2017). Aunque los gabapentinoides sólo se unen a una diana específica, la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, esta interacción tiene múltiples consecuencias sobre la transmisión sináptica (Tabla 8), ejerce acciones selectivas sobre tipos neuronales concretos y altera la excitabilidad tanto a nivel espinal como en centros cerebrales superiores (Biggs et al., 2014; Patel & Dickenson, 2016; Alles et al., 2017). La multiplicidad de efectos podría explicar su efectividad terapéutica.

Por otra parte, la desregulación en la expresión de las trombospondinas (TSP) podría tener un papel importante en la efectividad de los gabapentinoides. Éstas son proteínas de la matriz extracelular secretadas por astrocitos en el SNC que están implicadas en la sinaptogénesis (Erglu et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que la TSP4 esta sobrerregulada en la médula espinal después de una lesión nerviosa periférica, hecho que correlaciona con el desarrollo del dolor neuropático. Además, se ha visto que la interacción de TPS4 con  $\alpha 2\delta$ -1 reduce la afinidad de los gabapentinoides por esta subunidad (Lana et al., 2016). Este hecho implica que la interacción de una proteína extracelular con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1, localizadas en la superficie extracelular de los terminales presinápticos, puede afectar a la afinidad de unión de los gabapentinoides a  $\alpha 2\delta$ -1 en la superficie celular, lo cual a su vez podría explicar una reducción de su efectividad. Además, la pérdida

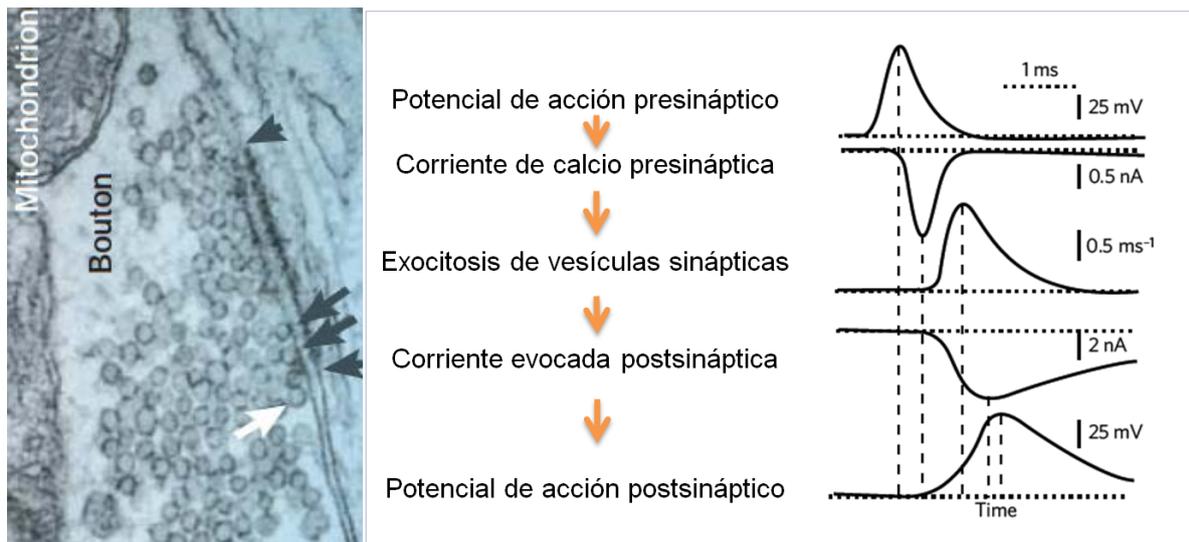
de efectividad de la gabapentina ha sido replicada en un modelo de dolor (*poststroke pain*), siendo atribuido a una regulación a la baja de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 con el tiempo, a pesar de continuar el dolor (Yang et al., 2016).

#### **4. PAPEL DE LOS DEPÓSITOS DE VESÍCULAS SINÁPTICAS EN LA NEUROTRANSMISIÓN.**

##### **4.1. Bases de la neurotransmisión.**

Las neuronas, a diferencia de cualquier otro tipo celular, son células polarizadas que reciben y transmiten información. La neurotransmisión es la forma de comunicación química entre las neuronas que sucede en sitios especializados denominados sinapsis. En las neuronas el potencial de acción (PA) se propaga a lo largo del axón, transmisor de la señal, hasta llegar y despolarizar los botones sinápticos. Dentro de estas estructuras presinápticas, las elevaciones de calcio intracelular producidas al llegar el potencial de acción desencadenan la liberación de neurotransmisores en una diana postsináptica, típicamente las dendritas de otra neurona. Esta transmisión de señales es la base bajo la cual se fundamenta la función de las redes neuronales, de vital importancia en comportamientos humanos como la coordinación de los movimientos, funciones cognitivas como la percepción, los pensamientos, el aprendizaje o la memoria.

No fue hasta la mitad del siglo XX cuando se llegó al conocimiento de los componentes de la neurotransmisión, tanto el eléctrico (Hodgkin & Huxley 1952) como el químico (Fatt & Katz 1952; Del Castillo & Katz 1954). En particular, Bernard Katz desarrolló la teoría cuántica de liberación del neurotransmisor –las moléculas de neurotransmisores se liberan en paquetes discretos– en colaboración con José del Castillo y Paul Fatt. Este trabajo, junto a las primeras imágenes de microscopía electrónica de una sinapsis (Sjöstrand, 1953; Palade, 1954) llevaron hasta la hipótesis vesicular de la neurotransmisión, que plantea que los neurotransmisores son almacenados en vesículas sinápticas y su liberación del interior vesicular forma las bases de la neurotransmisión cuántica (Del Castillo & Katz, 1956). El número de vesículas sinápticas en un terminal varía según el tipo neuronal oscilando entre varias docenas hasta unas mil vesículas. Algunas vesículas se localizan adyacentes a la zona activa electrodensa rica en proteínas donde tiene lugar la fusión (Figura 16, indicadas con la flecha blanca), mientras que otras están diseminadas por el resto del área del botón sináptico (Figura 16).



**Figura 15. Curso temporal en la transmisión sináptica.** Cuando un potencial de acción invade el terminal presináptico, los canales de calcio se abren y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  induce la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, permitiendo así la liberación de los neurotransmisores que contienen las vesículas al espacio sináptico. Los neurotransmisores se unen entonces a los receptores postsinápticos para completar la transferencia de la información. El proceso general es increíblemente rápido, con cada uno de los pasos principales (fusión de las vesículas sinápticas y recepción de la señal postsináptica) iniciado en menos de 1ms. Se indican los cinco pasos secuenciales medidos electrofisiológicamente en la sinapsis del cálce de Held de rata. Modificado a partir de: Südhof, 2008.

A lo largo de los últimos cuarenta años numerosos estudios han generado una cantidad ingente de información sobre la vital importancia de las vesículas sinápticas para la función de los terminales presinápticos, entre ellos los mecanismos que median la recaptación de los neurotransmisores en las vesículas sinápticas (Blakely & Edwards 2012), la fusión-calcio dependiente de las vesículas con la membrana plasmática (Südhof & Rizo 2011; Südhof, 2012) o los modelos de reciclaje vesicular (Harata et al., 2006). En resumen, las vesículas sinápticas son componentes estructurales vitales para la función de los terminales presinápticos. La disrupción en la liberación de vesículas genera déficits en la neurotransmisión, base bajo la cual subyacen varios trastornos neurológicos o psiquiátricos.

#### 4.2 Las vesículas sinápticas se organizan en depósitos.

Un terminal presináptico maduro está densamente empaquetado con numerosas vesículas sinápticas que se organizan en diferentes depósitos. La diferente localización de las vesículas sinápticas dentro de un terminal presináptico es uno de los factores determinantes para la eficiencia de la neurotransmisión. Estos depósitos tienen especial relevancia en la fisiología presináptica contribuyendo directamente a la plasticidad sináptica a corto término además de regular la fuerza sináptica y la plasticidad neuronal. En particular, la fuerza sináptica puede analizarse

a través de dos parámetros: el tamaño del *Readily Releasable Pool* (RRP, o depósito de liberación rápida) y la probabilidad de liberación ( $P_r$ ) de cada vesícula del RRP en respuesta a un potencial de acción. En el 2005, Rizzoli y Betz propusieron un modelo unificador sobre la terminología de los diferentes depósitos diferenciando tres depósitos de vesículas funcionales:

Un primer depósito de vesículas ancladas a la zona activa, denominado **depósito de liberación rápida** o **RRP** (del inglés *Readily Releasable Pool*). Son las que presentan mayor probabilidad de ser liberadas. Mantienen la neurotransmisión y modifican la plasticidad. Bajo intensa estimulación es el primer depósito que se agota, favoreciendo la depresión sináptica. Dependiendo del tipo de sinapsis pueden representar hasta el 5% del clúster vesicular. Las vesículas que componen el RRP han sido correlacionadas con aquellas vesículas físicamente ancladas a la membrana presináptica. Éstas se encuentran directamente implicadas en procesos de plasticidad a corto plazo al ser un parámetro determinante en la probabilidad de liberación (Dobrunz, LE; 2002).

El segundo depósito es el **depósito de reciclaje** (**RP**, *recycling pool*). Son las vesículas que rellenan el RRP y las siguientes en liberarse durante periodos de actividad moderada, después de agotarse el RRP. Este depósito supone entre el 10-25% de las vesículas.

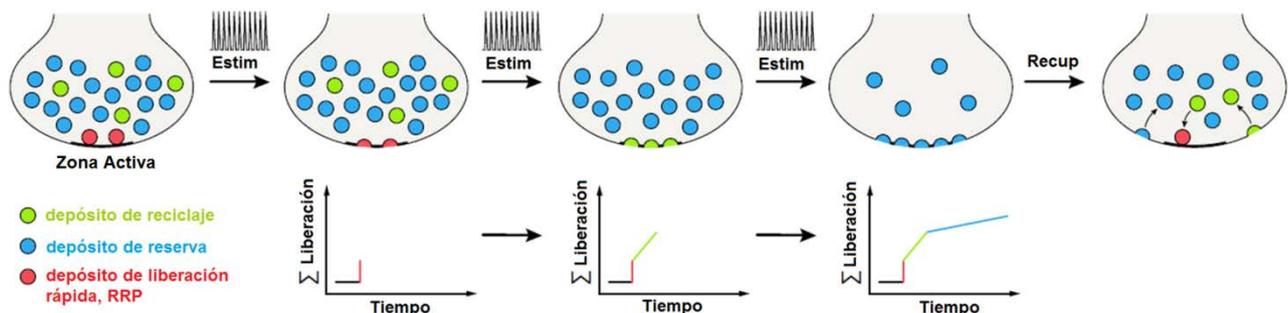
El tercer depósito es el **depósito de reserva**, únicamente liberado durante episodios de intensa estimulación 'no fisiológica' (Rizzoli & Betz 2005). Supone entre el 75-90% de las vesículas. Tiene tasas de exocitosis más lentas al situarse físicamente más alejadas de la zona activa. Además, las vesículas de este depósito tienen una movilidad reducida por el citoplasma y se mezclan menos con las vesículas de los otros dos depósitos.

Depósito	Depósito de liberación rápida, RRP	Depósito de reciclaje, RP	Depósito de reserva
Tamaño del % total de vesículas	~1-5%	~10-25%	~75-90%
Localización de las vesículas	Ancladas a la zona activa	Dispersas en el clúster citoplasmático	Formando el clúster citoplasmático, lejos de la zona activa
Tiempo de liberación	<1s a alta Frecuencia	Pocos segundos a alta Frecuencia	Min-h
Reciclaje	Rápido <10s	Rápido (s)	Más lento (s)
Mezcla con otros depósitos	Rápida mezcla con el RP	Mezcla con el RRP y lenta mezcla con el de reserva	Mezcla lenta con el RRP y RP

**Tabla 9. Principales características de las vesículas sinápticas.** Modificado de: Rizzoli & Betz 2005

Los depósitos de vesículas presentan diferentes cinéticas de liberación (Denker & Rizzoli, 2010). Cuando son sometidos a una estimulación a baja frecuencia, el terminal libera de forma parcial el RRP. Las vesículas de la zona activa que son liberadas cuando llega un potencial de acción, son después rellenadas con vesículas de otros depósitos citoplasmáticos, manteniéndose así la respuesta de una sinapsis sin que se produzca depresión. Por el contrario, cuando una sinapsis se somete a una actividad continuada, el depósito de vesículas del RRP es el primero que se libera completamente, seguido de las vesículas del RP, que son relativamente móviles. Finalmente, y si la actividad permanece de forma sostenida, las vesículas citoplasmáticas que se encuentran más retenidas en el depósito de reserva se liberan, produciéndose depresión sináptica. Cuando la actividad finaliza, estos depósitos se vuelven a recuperar en cuestión de segundos/minutos.

Estimulación continuada



**Figura 16. Cinética de los depósitos de vesículas sinápticas frente a una estimulación sostenida en el tiempo.** El RRP es el primer depósito en liberarse. A continuación se liberan las vesículas sinápticas del RP dispersas por el citoplasma y por último se liberan las vesículas del depósito de reserva, más retenidas. Los depósitos terminan agotándose con una actividad continuada y se alcanza la depresión sináptica. Con el fin de la actividad, el terminal recupera sus diferentes depósitos. Modificado de: Denker & Rizzoli, 2010.

#### 4.3 Medidas del depósito de liberación rápida.

Para medir el tamaño y la cinética de los diferentes depósitos de vesículas en el terminal presináptico se pueden seguir diversas estrategias. Entre las técnicas más utilizadas para observar y cuantificar los depósitos de vesículas están: **(a)** el uso de la microscopía electrónica, **(b)** el uso de la microscopía óptica utilizando colorantes fluorescentes de la familia de los FM o indicadores fluorescentes codificados genéticamente como la sinaptofluorina, **(c)** el uso de soluciones con alta osmolaridad y **(d)** el uso de la electrofisiología.

Todos los métodos usados para determinar el RRP requieren la cuantificación de las vesículas fusionadas. Una de las aproximaciones más comunes para cuantificar la liberación de neurotransmisores es medir las corrientes postsinápticas (Thanawala & Regehr, 2016; Kaeser & Regehr, 2017). Para medir de forma precisa el RRP el principal reto es liberar todas las vesículas de este depósito. Su tamaño queda estimado a la baja si la depleción de las vesículas del RRP es incompleta mientras que su tamaño se sobreestima si por ejemplo las vesículas rellenas contribuyen a su medida. Cuando utilizamos técnicas electrofisiológicas, la estimación del tamaño del RRP depende de la intensidad de la estimulación. Entre los métodos más utilizados para liberar el RRP se encuentra la aplicación de soluciones con una alta osmolaridad (normalmente 500mM sucrosa) y los trenes de estímulos a alta frecuencia.



**Figura 17. Registros representativos mostrando el vaciado del depósito de liberación rápida (RRP).** A) Registro mostrando una respuesta autáptica evocada a una alta frecuencia de estimulación. B) Registro que muestra una respuesta autáptica evocada por la aplicación de una solución hipertónica (500mM sucrosa). Modificado de: Ikeda & Bekkers (2009)

Las soluciones con alta osmolaridad provocan la fusión de las vesículas del RRP de modo calcio independiente. Este método se ha usado ampliamente para estudiar las funciones de proteínas específicas en el control del RRP utilizando ratones knockout. Sin embargo, este método proporciona estimaciones al alza del RRP comparado con las estimaciones basadas en la liberación evocada por trenes de estímulos. La medida del RRP usando trenes de potenciales de acción mide la liberación sincrónica que ocurre en los milisegundos siguientes a cada PA presináptico y no tienen en cuenta la liberación asincrónica, que no contribuye al pico de las corrientes. En este método se representan las amplitudes cumulativas de los EPSCs en función del número de estímulos. En estas representaciones se observa un salto inicial seguido de una fase lineal. Durante una estimulación prolongada, la fase lineal de la respuesta se da como consecuencia del relleno de

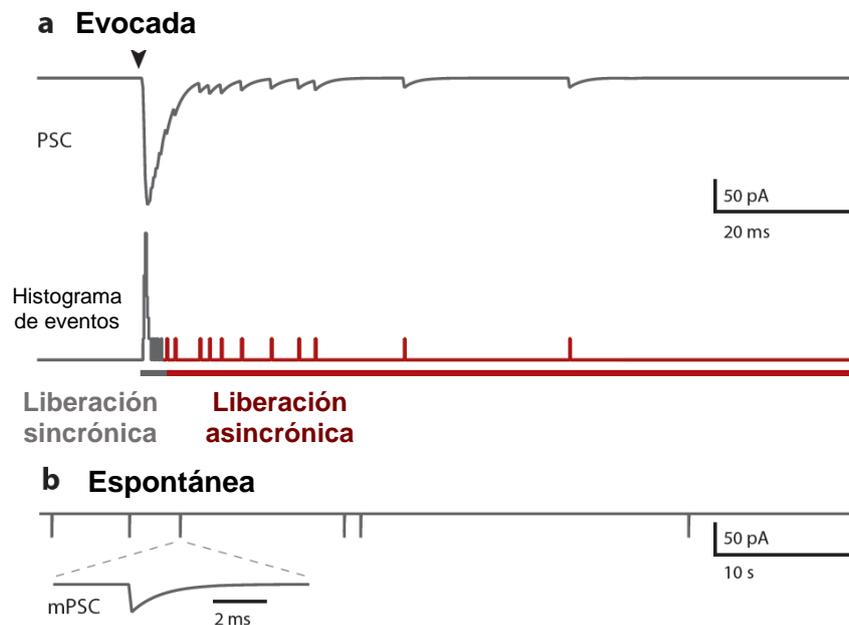
vesículas. El ajuste a una función lineal permite calcular la medida del RRP mediante la extrapolación al eje de ordenadas (Kaeser & Regehr, 2017). En general, este método proporciona estimaciones a la baja del RRP y lo ideal es usar más de un método para determinar de forma fiable el tamaño del RRP.

#### 4.4 Modalidades de liberación de neurotransmisores.

Existen tres modos de liberación de neurotransmisores: la **liberación sincrónica**, que ocurre pocos milisegundos después de la llegada de un potencial de acción en el botón presináptico, la **liberación asincrónica**, que persiste desde décimas de milisegundos hasta decenas de segundos después de la llegada de un potencial de acción o una serie de PA, tras el cierre de los VGCCs, y la **liberación espontánea** de neurotransmisores, que ocurre en la ausencia de una despolarización presináptica (Figura 19).

Un distintivo de la comunicación neuronal es su velocidad, que requiere una rápida transmisión sináptica. Cuando un potencial de acción invade un botón presináptico, los canales de calcio voltaje-dependientes se abren brevemente, produciéndose un aumento local e intenso de  $\text{Ca}^{2+}$  intraterminal. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a su sensor para inducir la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica. En la mayoría de las sinapsis las vesículas se fusionan en menos de un milisegundo, dando lugar a la **liberación sincrónica** de neurotransmisores. Para alcanzar este grado de sincronización, los canales de calcio han de abrirse brevemente cuando llega el potencial de acción, desactivándose y cerrándose muy rápido durante la fase de repolarización del potencial de acción. La liberación sincrónica se produce debida a la alta concentración local de  $\text{Ca}^{2+}$  cerca de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  abiertos. Entre los mecanismos que son críticos para la liberación sincrónica están: 1) la generación y mantenimiento de un depósito de liberación rápido de vesículas, fácilmente excitable cuando entra  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes tiene que suceder con un retraso mínimo después de la llegada del potencial de acción; 3) la maquinaria de liberación de vesículas sinápticas debe estar preparada para responder de forma rápida y precisa a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto cuando aumentan de forma rápida como cuando la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  decae; y 4) el canal de calcio presináptico tiene que estar acoplado

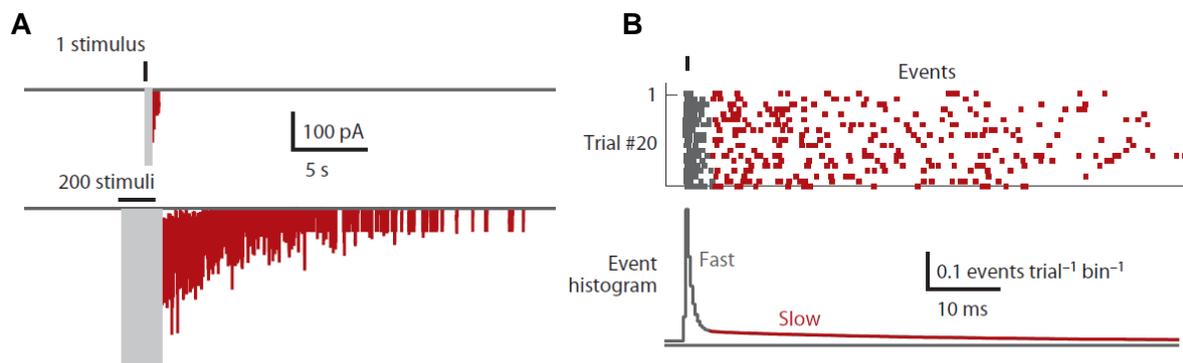
especialmente al mecanismo sensor del  $\text{Ca}^{2+}$ , para reconocer rápidamente los incrementos y descensos de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el canal se abre y se cierra.



**Figura 18. Diferentes modalidades de liberación de neurotransmisores.** A) En el ejemplo una estimulación (flecha) evoca la liberación sincrónica y asincrónica de neurotransmisores. PSP: Corriente postsináptica (acrónimo del inglés: *Post-Synaptic Current*) B) Liberación espontánea de neurotransmisores. mPSC: corrientes postsinápticas en miniatura (acrónimo del inglés: *miniature Post-Synaptic Current*). Modificado de: Kaeser & Regehr, 2014.

La **liberación asincrónica** sucede después del cierre de los canales de calcio voltaje-dependientes. En la mayoría de las sinapsis la liberación sincrónica representa casi toda la liberación (>90%) a frecuencias de estimulación bajas (Kaeser & Regehr, 2014). Sin embargo, la liberación asincrónica es prominente en algunas sinapsis especializadas como por ejemplo las establecidas entre interneuronas inhibitorias del asta dorsal de la médula espinal (Labrakakis et al., 2009). En la mayoría de las sinapsis, bajas frecuencias de estimulación evocan principalmente una liberación sincrónica, sin embargo frecuencias de estimulación sostenidas evocan también una liberación asincrónica. Además, se ha demostrado que tanto la liberación sincrónica como la asincrónica comparten los mismos depósitos de vesículas y que su amplitud está relacionada negativamente. Por ejemplo, el efecto de eliminar el sensor rápido de  $\text{Ca}^{2+}$ , sinaptotagmina 1, elimina la liberación sincrónica y provoca un incremento en la magnitud de la liberación asincrónica.

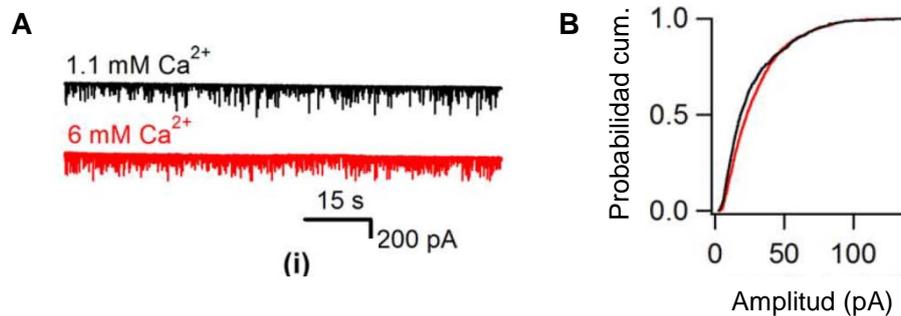
También existen importantes diferencias entre los mecanismos calcio-dependientes que median la liberación sincrónica y asincrónica. Estudios sobre la dependencia del calcio en la fusión de vesículas sinápticas indican que la liberación asincrónica también es mediada por un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  especializado. Sin embargo, el origen de este sensor se desconoce y se ha sugerido que se encuentra más alejado de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con los sensores rápidos de  $\text{Ca}^{2+}$ , respondiendo a aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos importantes, en lugar de responder a elevaciones locales de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 19. Propiedades de la liberación asincrónica.** A) En la mayoría de las sinapsis, una única estimulación evoca la liberación sincrónica de neurotransmisores durante pocos milisegundos. Por el contrario, frecuencias de estimulación prolongadas producen una liberación asincrónica que dura varias decenas de segundos. B) La liberación asincrónica se cuantifica construyendo histogramas a partir de la detección de eventos cuantales individuales para así identificar el componente de liberación correspondiente a la liberación asincrónica Modificado de: Kaeser & Regehr, 2014.

El tercer modo de liberación de neurotransmisores corresponde a la **liberación espontánea** (Figura 20). Se caracteriza por tener lugar en ausencia de una despolarización presináptica y, al igual que en el caso de la liberación asincrónica, parece estar controlada por múltiples mecanismos moleculares que difieren de manera importante de aquellos implicados en la liberación sincrónica. Entre las propiedades de la liberación espontánea se ha observado que una gran fracción parece ser independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Bloqueando los canales de calcio voltaje dependientes y utilizando agentes quelantes de calcio, se ha demostrado que se mantiene intacta una fracción importante de la liberación espontánea. No obstante, no se conoce si la restante liberación espontánea es calcio-independiente. Para estudiar la liberación espontánea se miden las corrientes sinápticas en miniatura (mPSCs) en presencia de tetrodoxina (TTX) para bloquear los canales de sodio voltaje-dependientes y prevenir los potenciales de acción. El promedio del tamaño de los eventos se relaciona con una medida del número promedio de receptores en

la densidad postsináptica, mientras que el promedio en la frecuencia de los eventos se relaciona con el número de sitios de liberación y con la probabilidad de liberación.

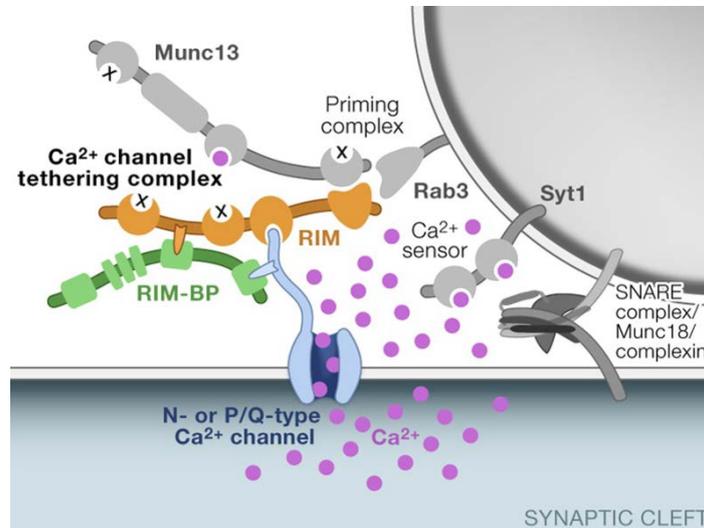


**Figura 20. Liberación espontánea.** A) Ejemplo de corrientes excitatorias sinápticas en miniatura (mEPSCs) en un cultivo neuronal del neocórtex en presencia de una concentración de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 1.1mM (negro) o 6mM (rojo). B) Distribución de la probabilidad acumulativa de las amplitudes de los mEPSCs. Modificado de: Williams & Smith, 2017.

#### 4.5 Los canales de calcio voltaje-dependientes del terminal presináptico.

Los VGCCs son otro de los principales componentes estructurales de los terminales presinápticos. Están directamente implicados en la transmisión sináptica evocada, tanto sincrónica como asincrónica. Estos canales se expresan fundamentalmente en los terminales presinápticos y se abren en respuesta a la llegada de un potencial de acción. La entrada de iones de calcio resultante provoca la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica, que culmina con la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico. Los tres principales subtipos del canal Cav2 (Cav2.1-P/Q; Cav2.2-N y Cav2.3-R) están implicados en la liberación rápida de neurotransmisores. Además, tienen otras funciones como la liberación de hormonas en las células neurosecretoras, por ejemplo en las células cromafines. Tanto los canales Cav2.1 (P/Q) como Cav2.2 (N) contienen un sitio de interacción con proteínas sinápticas, denominado synprint, que interacciona con las proteínas syntaxina 1A y SNAP25. A través de esta interacción, los canales pueden estar localizados en proximidad con las vesículas sinápticas. Los canales de calcio tipo P/Q y N también interaccionan con las proteínas de la zona activa de la familia de las RIM y RIM-BPs (Figura 21) y se ha demostrado que los canales de calcio son reclutados a las zonas activas a través de su unión simultánea a RIM y RIM-BP (Südhof, 2012). Por otra parte, además de promover la liberación de vesículas sinápticas, varios miembros de los canales de calcio dependientes de voltaje como Cav2.1 (P/Q) y Cav2.2 (N) se encuentran asociados a los canales de potasio

activados por calcio ( $BK_{Ca}$ ), proporcionando el flujo de calcio necesario para activar eficientemente estos canales. Por lo tanto, a través de su interacción con los  $BK_{Ca}$ , los canales de calcio voltaje-dependientes pueden regular la excitabilidad neuronal alterando las conductancias del potasio (Loane et al., 2007).



**Figura 21. Proteínas presinápticas implicadas en la fusión de vesículas sinápticas.** Los VGCCs tienen una localización privilegiada próxima a los complejos de proteínas que median la exocitosis dependiente de calcio. La proteína de la zona activa RIM, forma un andamiaje enlazando los VGCCs con Munc-13 y con las vesículas sinápticas vía Rab3. RIM recluta los VGCCs de tipo N y P/Q a través de su dominio PDZ. La proteína RIM-BP contiene tres dominios SH3 que interaccionan con los VGCCs y a la vez con las secuencias ricas en prolina de las proteínas RIMs. El complejo formado por las proteínas RIMs, RIM-BP y la cola C-terminal de los canales de calcio es importante para la localización de los VGCCs en la zona activa. La entrada de calcio por estos canales desencadena la fusión de vesículas sinápticas provocando una cascada de interacciones proteína-proteína (las proteínas clave en este proceso son la sinaptotagmina, las proteínas SNARE [sinaptobrevina, sintaxina, y SNAP-25], Munc18 y la complexina) Modificado de: Li et al., 2015.

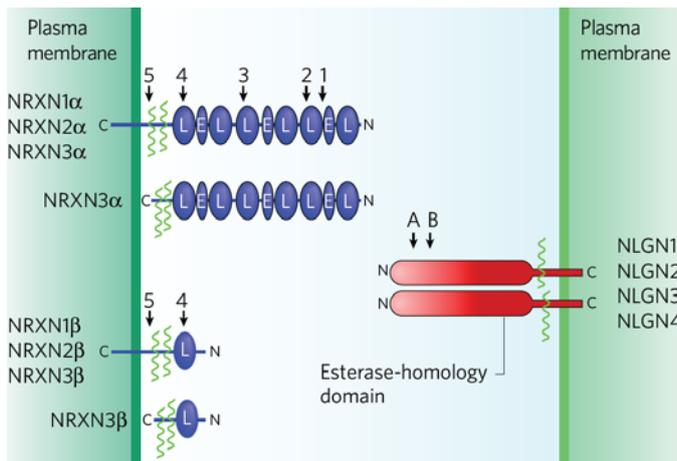
Los papeles fundamentales que desempeñan los canales de calcio voltaje-dependientes en la función y comunicación neuronal hacen que sean críticos en múltiples funciones fisiológicas, que van desde el control motor a la transmisión de la información sensorial. Su vital función está ejemplificada en las diversas condiciones patológicas que suceden cuando hay una disfunción del canal. Por ejemplo, los efectos de la depleción del canal Cav2.2 sobre el dolor son consistentes con la noción de que los canales Cav2.2 son críticos a la hora de liberar neurotransmisores desde los terminales aferentes a las neuronas de la médula espinal (Bourinet et al., 2014), validándolos como una diana potencial en la búsqueda de nuevos analgésicos.

#### 4.6 Implicación de las neurexinas en la neurotransmisión.

Diversas familias de proteínas sinápticas de adhesión conforman el espacio extracelular de una sinapsis. Estas proteínas, además de tender puentes entre las especializaciones pre- y postsinápticas organizando estructuralmente las sinapsis, son fundamentales en múltiples procesos como la formación, maduración y plasticidad sináptica (Dalva et al. 2007). Entre ellas, una de las familias más estudiadas son las neurexinas (presinápticas) y neuroliginas (postsinápticas) (Reissner et al., 2013).

Las neurexinas fueron descubiertas como receptores para la  $\alpha$ -latrotoxina, una toxina secretada por la araña viuda negra (*Latrodectus mactans*) que induce la liberación masiva de neurotransmisores en vertebrados (Ushkaryov et al., 2008). Éstas son proteínas transmembrana de tipo I que están codificadas por tres genes en mamíferos (*NRXN1- NRXN3*). Cada gen de la neurexina codifica dos isoformas proteicas diferentes que se transcriben a través de promotores independientes: la  $\alpha$ -neurexina y  $\beta$ -neurexina. Las secuencias extracelulares amino-terminales difieren en los dos tipos de neurexinas mientras que la región transmembrana carboxi-terminal es idéntica en ambas isoformas. Las  $\alpha$ -neurexinas presentan un dominio extracelular más grande que las  $\beta$ -neurexinas, que consiste en una repetición de un *cassette* de 3 repeticiones de los dominios LG-EGF-LG (LG: dominios homólogos a laminina G y EGF: dominios similares al factor de crecimiento epidérmico) (Figura 22).

Las distintas variantes de neurexina actúan predominantemente en el terminal presináptico donde son esenciales para la transmisión sináptica calcio-dependiente en diversos tipos de sinapsis, tanto inhibitorias como excitatorias, en el sistema nervioso central y periférico. Una de sus características más estudiadas es su capacidad para unirse extracelularmente a proteínas de otras neuronas con las que están conectadas sinápticamente, como por ejemplo la proteína postsináptica neuroligina. Las isoformas de la neurexina unidas a las neuroliginas pueden formar complejos trans-sinápticos en sinapsis tanto excitatorias como inhibitorias que tienen funciones relevantes en el establecimiento, la maduración y en la plasticidad sináptica (Missler et al., 2003; Südhof, 2008).



**Figura 22. Topología de las neurexinas.** Las neurexinas son proteínas de adhesión celular que funcionan principalmente en la superficie celular de las neuronas. En la imagen se muestran las dos isoformas proteicas diferentes para las que codifica cada gen (*NRXN1-NRXN3*) de las neurexinas: la  $\alpha$ -neurexina y  $\beta$ -neurexina. El dominio extracelular de las  $\alpha$ -neurexinas está formado por la repetición de seis dominios LG intercalados con tres dominios EGF (LG: *laminin like globular domain*; EGF: *epidermal like growth factor domain*) Modificado de: Südhof, 2008.

Estudios utilizando ratones triple *knockout* para la proteína  $\alpha$ -neurexina ha demostrado que las  $\alpha$ -neurexinas no son necesarias para la formación de las sinapsis, pero por el contrario son esenciales en la exocitosis  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de neurotransmisores (Missler et al., 2003). La supresión de dos o tres de las isoformas de las  $\alpha$ -neurexinas produce una alteración severa en la liberación evocada de neurotransmisores en sinapsis excitatorias e inhibitorias del neocórtex y del tronco cerebral. Missler y colaboradores alegaron que la alteración en la liberación de neurotransmisores es debida a una marcada reducción en la función de los canales de calcio sinápticos, al observar una considerable reducción en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y a una pérdida de respuesta hacia sus bloqueantes específicos, como la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Missler et al., 2003). Además no observaron una alteración en el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie celular en los animales *knockout*. Por tanto, estos datos parecen sugerir que las  $\alpha$ -neurexinas podrían organizar los terminales presinápticos acoplando los canales de de calcio voltaje-dependientes con la maquinaria presináptica. Por otra parte, se ha demostrado recientemente en *C. elegans* que los dominios extracelulares LG1 y LG5 de la neurexina-1 $\alpha$  interaccionan directamente con la subunidad reguladora extracelular del canal de calcio  $\alpha 2\delta$ -3, siendo éste un mecanismo conservado para regular la transmisión sináptica (Tong et al., 2017). Esta interacción se vuelve relevante tras el corte proteolítico de la neurexina-1 $\alpha$  por proteínas como las metaloproteasas o ADAMS, que produce la liberación del ectodominio, inhibiendo la transmisión sináptica a través de la alteración de la función en los canales de calcio de tipo N. Además, recientemente también se ha propuesto que las  $\alpha$ -neurexinas, de forma conjunta con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1, pueden regular la entrada de calcio a través de los canales de tipo P/Q (Brockhaus et al., 2018).

## **5. LOS CANALES DE CALCIO VOLTAJE DEPENDIENTES COMO DIANA DEL DOLOR NEUROPÁTICO.**

### **5.1 Los canales de calcio de tipo N como diana terapéutica.**

Los canales iónicos representan dianas altamente atractivas para el descubrimiento de nuevos fármacos (Yekkirala et al., 2017). El flujo de iones a través de los canales iónicos proporciona las bases de la excitabilidad de la membrana y de la neurotransmisión, procesos esenciales para el funcionamiento adecuado de las neuronas, células musculares y cardíacas. Entre ellos, los canales iónicos dependientes de voltaje representan una de las principales dianas en la búsqueda de nuevos fármacos para aliviar el dolor neuropático. Particularmente, debido al esencial papel de los canales de calcio de tipo N (Cav2.2) en la señalización del dolor, al controlar la transmisión sináptica entre las neuronas del ganglio de la raíz dorsal y las neuronas del asta dorsal en la médula espinal, éstos representan una diana válida para la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos. En la actualidad, el único fármaco en el mercado que actúa inhibiendo la entrada de calcio en el canal Cav2.2 es ziconotide (Prialt®, Elan Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda). Este fármaco es un polipéptido de 25aa que actúa bloqueando el canal Cav2.2 con alta afinidad y especificidad. Tiene eficacia demostrada aliviando el dolor severo crónico y el dolor postoperatorio. Además, no genera tolerancia y es eficaz en pacientes resistentes a los opioides, siendo además 100 veces más potente que la morfina. Desafortunadamente, el beneficio terapéutico de este compuesto requiere su administración intratecal y tiene importantes efectos adversos incluyendo mareos, náuseas, confusión o dolor de cabeza.

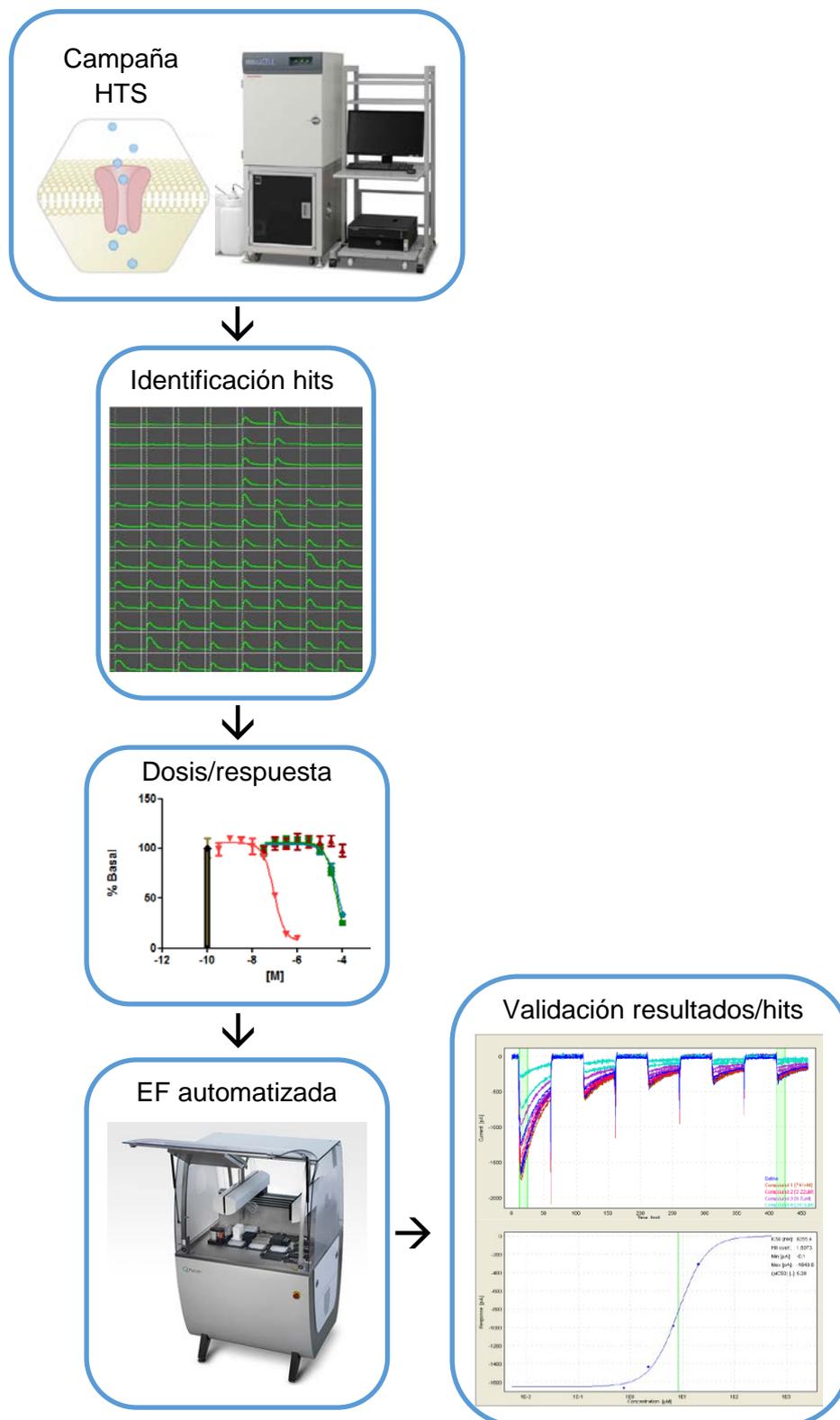
No obstante, la eficacia demostrada del ziconotide ha proporcionado un fuerte impulso para buscar nuevas moléculas de pequeño tamaño, que sean activas administradas oralmente, que presenten perfiles de seguridad mejorados y que actúen inhibiendo el canal Cav2.2 de forma estado-dependiente. Sin embargo, hasta la fecha todos los candidatos han tenido una pobre potencia bloqueando el canal, en comparación a la conotoxina, y/o una falta de selectividad frente a los canales de calcio cardíacos, particularmente los canales tipo L. Actualmente hay varios compuestos en diferentes fases de ensayos clínicos cuya diana son los canales de calcio voltaje-dependientes. Entre ellos se encuentran Z944 (Zalicus), un bloqueante selectivo de los canales de calcio tipo T, que es activo administrado oralmente y que

se encuentra en fase 1b; CNV2197944 (Convergence), una pequeña molécula que bloquea selectivamente los canales de calcio de tipo N, diseñada para inhibir especialmente canales Cav2.2 altamente activos, en fase 2; y TROX-1 (Grünenthal), molécula que actúa bloqueando los canales de calcio Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3. Este compuesto es un inhibidor estado-dependiente del canal, que se une más firmemente a estados activados del canal que cuando éste se encuentra en reposo, cerrado (Yekkirala et al., 2017). En el caso de CNV2197944 (Convergence) no se demostró su eficacia en la fase 2, a pesar de ser bien tolerado a la dosis administrada y una nueva compañía está valorando utilizar otras dosificaciones y/o dar nuevos usos a esta molécula ([http://www.calchan.co.uk/?page\\_id=15](http://www.calchan.co.uk/?page_id=15)).

## **5.2 Desarrollo de ensayos para el cribado de alto rendimiento del canal de calcio de tipo N.**

Las campañas de cribado de alto rendimiento (HTS, acrónimo del inglés *High-Throughput Screening*) requieren métodos fáciles de monitorizar, que sean rápidos, robustos, fiables y miniaturizables para poder analizar miles de compuestos sobre una diana concreta en un periodo de tiempo corto, con el fin de encontrar agentes farmacológicos activos. Muy pocos métodos satisfacen todos estos requisitos. Entre las nuevas aproximaciones para cribar grandes quimiotecas, se han desarrollado ensayos fluorescentes para estudiar algunas de las principales dianas en la industria farmacéutica, entre los que se encuentran los receptores acoplados a proteínas G y los canales iónicos voltaje-dependientes (Dunlop et al., 2008). A pesar de su aparente validación como dianas para la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos, uno de los principales obstáculos para el descubrimiento de nuevos fármacos activos sobre canales iónicos es la falta de plataformas de alto rendimiento que utilicen técnicas electrofisiológicas para caracterizar la actividad de un número elevado de compuestos. Por ello, el desarrollo de ensayos que permitan realizar cribados de alto rendimiento de diferentes canales iónicos representa un reto para las compañías farmacéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos que alivien el dolor. Entre ellos, se encuentran los ensayos de movilización de calcio que usan indicadores fluorescentes para evaluar la farmacología del canal Cav2.2. Este ensayo puede usarse para cribar quimiotecas de un gran número de compuestos de manera fiable y eficiente en la búsqueda de inhibidores del canal Cav.2.2 (Benjamin et al., 2006; Lubin et al., 2006; Finley et al., 2010). En este ensayo, la entrada de calcio a través del canal de calcio de tipo N se detecta usando un indicador de calcio

fluorescente y un lector después de dar un estímulo despolarizante con una alta concentración de KCl.



**Figura 23. Fases de una campaña de cribado de alto rendimiento.** Una vez realizada una campaña de cribado de alto rendimiento sobre una librería de compuestos (ej. mediante un ensayo de movilización de calcio), se obtienen una serie de *hits* positivos o posibles candidatos que han de ser confirmados y caracterizados farmacológicamente. Posteriormente, se valida la farmacología de los mejores candidatos mediante electrofisiología automatizada y/o manual.



# OBJETIVOS



La presente tesis doctoral plantea dos objetivos principales desglosados en los siguientes objetivos específicos:

**1.** Caracterizar cómo la interacción de los gabapentinoides con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 afecta a la neurotransmisión.

**1.1** Establecer registros simultáneos de la actividad pre- y postsináptica.

**1.2** Discriminar el efecto de los gabapentinoides sobre los componentes presináptico y postsináptico de la neurotransmisión.

**1.3** Identificar mecanismos endógenos que compitan con la acción de los gabapentinoides.

**2.** Identificar nuevos compuestos que actúen como bloqueantes del canal de calcio voltaje-dependiente de tipo N.

**2.1** Establecer las bases de una metodología de *High Throughput Screening*.

**2.2** Elaborar una lista de compuestos con potencial interés farmacológico.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. CULTIVOS CELULARES.

Para el estudio de los objetivos de esta tesis, se emplearon dos tipos de cultivos celulares. Principalmente se usaron cultivos primarios de neuronas del ganglio cervical superior de rata establecidos en forma de microcultivos. Además para la producción de lentivirus como herramientas de infección y generación de transgénesis en las neuronas se usó la línea celular HEK-293T. Por otra parte, para la búsqueda de compuestos con potencial interés farmacológico sobre el canal de calcio dependiente de voltaje de tipo N, se utilizó la línea celular recombinante HEK-293 Cav2.2/ $\beta$ 3/ $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Kir2.1.

### 1.1. CULTIVOS PRIMARIOS. MICROCULTIVOS DE NEURONAS.

El uso de microcultivos de neuronas es un gran modelo para el estudio de las funciones sinápticas y de plasticidad, ya que una célula individual, *SCM* (acrónimo del inglés *Single-Cell Microculture*), establece contactos sinápticos consigo misma, y por lo tanto presenta, a la vez, el componente presináptico y postsináptico. A este tipo de *SCMs* de neuronas se les conoce, también, con el nombre de cultivos autápticos.

La gran ventaja de este sistema es que evita la interferencia de otras neuronas en el circuito sináptico, facilitando la interpretación de los resultados obtenidos. En consecuencia los registros electrofisiológicos se llevan a cabo con un sólo electrodo, capaz de estimular y registrar las respuesta fisiológicas (Perez-González et al., 2008). Los cultivos se establecen a partir de neuronas del ganglio cervical superior (*SCG*, *Superior Cervical Ganglion*), que a diferencia de las neuronas del sistema nervioso central, SNC, requieren únicamente del factor trófico *nerve growth factor*, NGF, para poder crecer en ausencia de células gliales.

Bajo esta propiedad, la preparación resulta única para separar el posible efecto que la glía pudiera ejercer sobre la respuesta sináptica, y por lo tanto facilita el estudio de la interacción neurona-glía, así como la acción de los factores secretados por las células gliales sobre la neurotransmisión (Albrecht et al., 2012).

Las neuronas se obtuvieron del SCG de ratas albinas *Sprague-Dawley* entre los días 0-3 postparto (P0-P3). El procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de la Generalitat de Catalunya.

**1.1.1. Material.****Material quirúrgico (Fig. M1):**

- Pinzas “Dumont Tweezers #55” (ref: 14099, World Precision Instruments Ltd, UK)
- Tijeras “Superfine Vannas” punta recta 8cm de largo (ref: 501778 World Precision Instruments Ltd, UK)
- Tijeras “McPherson-Vannas” punta curva 12cm de largo (ref: 503364501778 World Precision Instruments Ltd, UK)

**Figura 24. Material quirúrgico para la disección**

- A) Pinzas “Dumont Tweezers #55”  
 B) Tijeras Superfine Vannas punta recta 8 cm de largo  
 C) Tijeras McPherson-Vannas punta curva 12 cm de largo

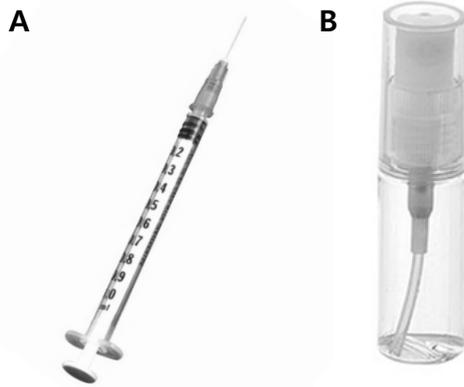
**Cubreobjetos:**

Para el establecimiento de los microcultivos, se han utilizado cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro (Thermo Scientific, Alemania) previamente esterilizados por sonicación en etanol al 70% (v/v), y expuestos 1h a radiación UV. Se han usado para realizar microcultivos destinados a registros electrofisiológicos y experimentos de inmunofluorescencia.

**Material de cultivo (Fig. M2):**

Material	Casa Comercial	Referencia
Cubreobjetos 15 mm diámetro	Thermo Scientific, Alemania	
2 Placas para cultivo celular de 12 pocillos estéril	TPP, Suiza	92012
3 Placas de Petri no estériles de 5.5 cm de diámetro		
Placa de Petri estéril de 10 cm de diámetro	TPP, Suiza	93100
Pipetas Pasteur de vidrio esterilizadas modificadas		
Jeringa de tres cuerpos estéril de 1 mL con aguja	Rubilabor, España	141.2001A
Cámara de Neubauer		
Frasco atomizador 12 ml	Tiendas Muji, <a href="http://www.muji.es">www.muji.es</a>	4945247030495
Tubo de centrifuga de 15 ml		
Tubo Eppendorf de 1.5 ml		

**Tabla 10. Material utilizado en el cultivo primario de neuronas**



**Figura 25. Jeringa de tres cuerpos y frasco atomizador.** A) Jeringa de tres cuerpos, empleada en la disgregación final y resuspensión de las neuronas, previo al sembrado en la placa de cultivo. B) Frasco atomizador de 12 ml utilizado para el depositado de microgotas del sustrato colágeno sobre el cubreobjetos donde se hará el sembrado de las neuronas.

### Soluciones:

- Solución de agarosa al 0.15 % (p/v) (ver soluciones)
- Tampón fosfato salino (PBS) estéril (ver soluciones)
- Solución de colágeno (ver anexo I de materiales y métodos)
- Agua bi-distilada estéril
- Etanol 70 % (v/v)
- Colagenasa IA 2.5 mg/mL en PBS estéril
- Tripsina-EDTA 0.05 % (Gibco®, ref: 25300-62)

Medio de cultivo pre-incubación	Medio de cultivo neuronal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)</li> <li>• 20 % (v/v) Suero bovino fetal, FBS (Invitrogen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)</li> <li>• 2.5 % (v/v) FBS (Invitrogen)</li> <li>• 2.5 % (v/v) Suero de Rata (RS)*</li> <li>• 5 nM NGF-7S (Alomone Labs, Israel)**</li> <li>• 2 nM CNTF (Alomone Labs, Israel)**, adicionados a partir del segundo cambio de medio.</li> <li>• 0.25 % (v/v) Penicilina-Estreptomicina (P/E) *** (ref: P0781, Sigma-Aldrich). La solución comercial con 0.9 % NaCl, cada mL de solución contiene 10000 unidades Penicilina / 10 mg Estreptomicina</li> </ul>

**Tabla 11. Medios de cultivo de los SCMs**

\* RS facilitado por el estabulario del Campus de Medicina de Bellvitge, Universidad de Barcelona

\*\* Los factores tróficos NGF y CNTF se añaden al medio inmediatamente antes del sembrado de las neuronas en la placa o antes del cambio de medio correspondiente.

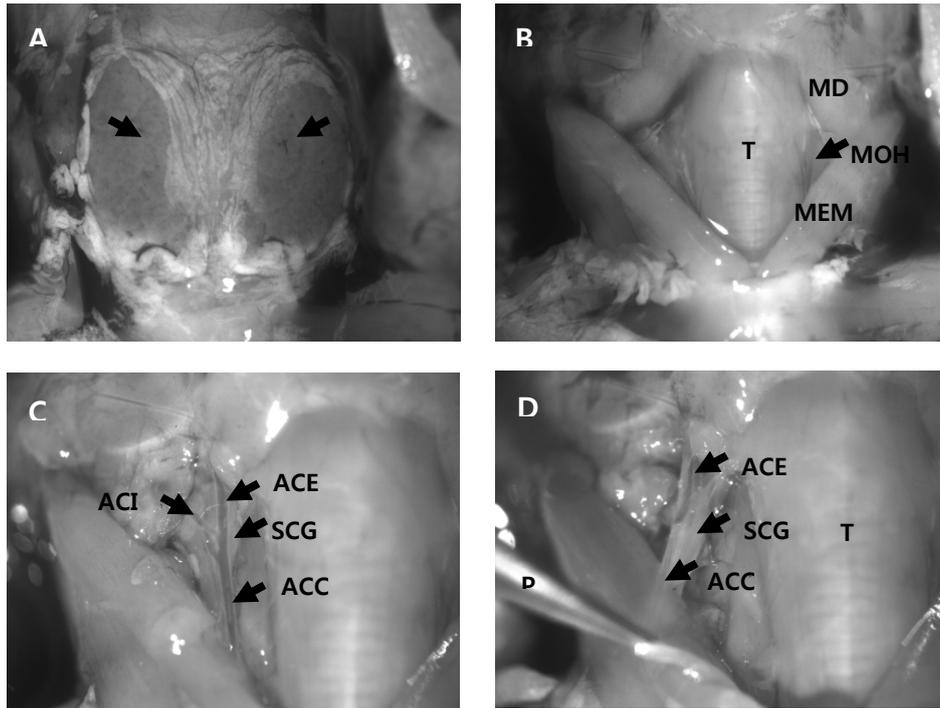
\*\*\* La dosis de 0.25 % (v/v) P/E es para momento de la siembra de las neuronas en la placa de cultivo. A partir del primer cambio de medio se aumenta la dosis a 0.5 % (v/v).

### 1.1.2. Procedimiento.

El primer paso para la realización del cultivo primario de las neuronas en forma de microcultivos, es el tratamiento de los cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente esterilizados, que son colocados en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Una vez colocados en los pocillos de las placas, los cubreobjetos son tratados con un sustrato no permisivo para el cultivo de neuronas, esto es, una solución de agarosa al 0.15% en agua bi-destilada estéril, como ha sido descrito para otros cultivos autópticos (Bekkers & Stevens, 1991). Al final del procedimiento, se rociarán las placas con una solución de colágeno. Sólo aquellas neuronas que se posen sobre las microgotas de colágeno se desarrollarán.

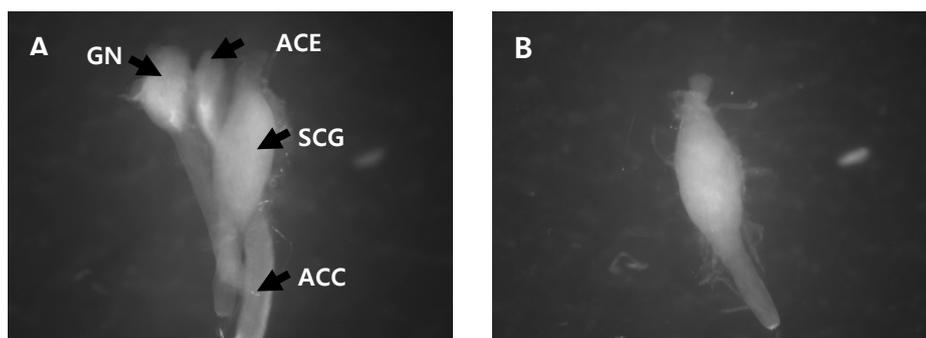
Previamente a la extracción de SCGs de rata, todo el material de disección es esterilizado con luz UV, dentro de la campana de flujo laminar horizontal (Nuaire, modelo UN-201-330E) sobre 1 hora. Las crías de rata son anestesiadas en hielo durante 15 minutos. El resto del procedimiento de disección, se mantiene a las crías a una temperatura fría (4 - 8° C) asegurando la anestesia en todo momento.

Bajo una lupa (*Leica M50*) a 2.5X de aumento, se realiza una incisión con las tijeras de punta curva, por la parte ventral del cuello de la cría de rata, y tras la extirpación de las glándulas salivares, la tráquea queda visible. Se separa el tejido linfático y glandular y se accede al tejido vasculo-nervioso profundo del cuello. Entre las diferentes estructuras se observa la arteria carótida común que se bifurca en la arteria carótida interna y externa, en forma de "Y". Con las pinzas *Dumont Tweezers #55*, se eleva la parte inferior de la arteria y queda expuesto el ganglio cervical superior, SCG, además de otras estructuras y tejidos. Con ayuda de las pinzas se continúa elevando la arteria carótida y con las tijeras *McPherson-Vannas*, de punta recta, se corta la parte más superior posible de las bifurcaciones carotideas externa e interna, y por último un corte por la parte más inferior posible de la arteria carótida común (Fig. 26). La estructura diseccionada contiene en su parte más dorsal el SCG y todo se coloca en una placa de Petri de 5,5cm con PBS 1X estéril a 4°C (Fig. 27A). Este procedimiento es bilateral en cada animal y se extraen los ganglios de 10-12 crías de rata.



**Figura 26. Disección y extracción del SCG de la cría de rata.** A) Vista de las glándulas salivares (flechas) tras el corte de la piel por la parte ventral del cuello. B) Vista de la Tráquea (T) y los músculos bilaterales esternomastóideo (MEM), disgástrico (MD) y omohoideo (MOH). C) Vista de la arteria carótida común (ACC) y su bifurcación carótida externa (ACE) e interna (ACI); además del ganglio cervical superior (SCG) por la parte dorsal de la arteria. D) Vista del SCG levantando con unas pinzas (P) la arteria carótida común (ACC).

Al finalizar todas las extracciones, el SCG se separa de la arteria carótida y del ganglio nodoso y además se retira el recubrimiento de tejido conectivo del SCG, para reducir la presencia de fibroblastos en el cultivo. Los SCG limpios se colocan en una placa de Petri de 5.5 cm de diámetro que contiene PBS 1x estéril (Fig. 27).



**Figura 27. Estructura del SCG.** A) Vista dorsal de la estructura resultante tras el corte de la carótida en los extremos de la ACE, ACI y la ACC. En la parte dorsal de la bifurcación de la arteria carótida encontramos el SCG. El ganglio nodoso (GN) se encuentra junto a la arteria carótida exterior. B) Imagen del SCG extraído y limpio para continuar con la disgregación mecánica y extracción de las neuronas.

Una vez se ha hecho la extracción fina de todos los SCG, nos desplazamos a una campana de flujo laminar vertical, específica para cultivos primarios, donde los colocamos en un tubo eppendorf de 1.5mL con 1mL de solución 2.5mg/mL de

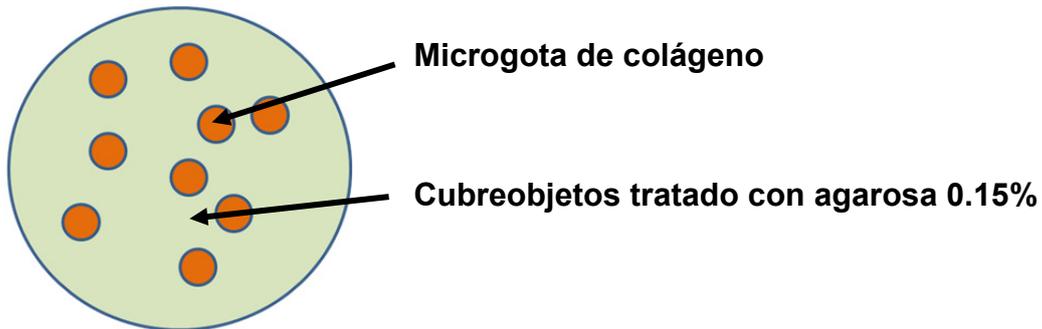
colagenasa tipo IA en PBS 1X estéril, a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se elimina la colagenasa, quedando los SCG en el fondo del eppendorf, y se adiciona 1mL de solución de 0.05 % Tripsina-EDTA (Gibco®, ref: 252300-62). Se mantienen 20 minutos en presencia de esta solución a 37°C. Transcurrido este tiempo se retira dicha solución y se adiciona 1mL del medio de pre-incubación para inactivar la actividad enzimática remanente. Posteriormente los SCG se traspasan a un tubo de centrifuga estéril de 15mL y se disgregan mecánicamente con el uso de las pipetas *Pasteur*, las cuales han sido modificadas previamente reduciendo su diámetro mediante un mechero *Bunsen* y su posterior esterilización.

Tras la disgregación de los ganglios y la disociación de las neuronas, éstas se traspasan a una placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro que contiene 10mL de medio de pre-incubación. La placa con las neuronas se coloca en un incubador a 37°C y 8% CO<sub>2</sub> durante 60-90 min. De esta forma las células gliales se posarán en el fondo de la placa más rápidamente, y las neuronas quedarán en flotación por más tiempo. A mayor tiempo de pre-incubación, habrá menor número de células gliales en el cultivo resultante; esto es, a 90 minutos de pre-incubación el cultivo final contará con una presencia de células gliales prácticamente nula.

Transcurrido este periodo intermedio, se recoge el sobrenadante de la placa Petri, y se coloca en un tubo de centrifugación de 15mL. Se centrifuga durante 2 minutos a 2000g a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retira el medio sobrenadante y el precipitado celular se resuspende con 1mL de medio de cultivo con las pipetas *Pasteur* modificadas y se transfiere todo el volumen a un tubo eppendorf de 1.5mL. Se recuenta el número total de neuronas con una cámara de Neubauer. El medio que contiene las células en suspensión se hace pasar tres veces por una jeringa estéril de 1mL y las neuronas se resuspenden en el medio de cultivo a una concentración final de 2500-3000 neuronas/mL de medio de cultivo.

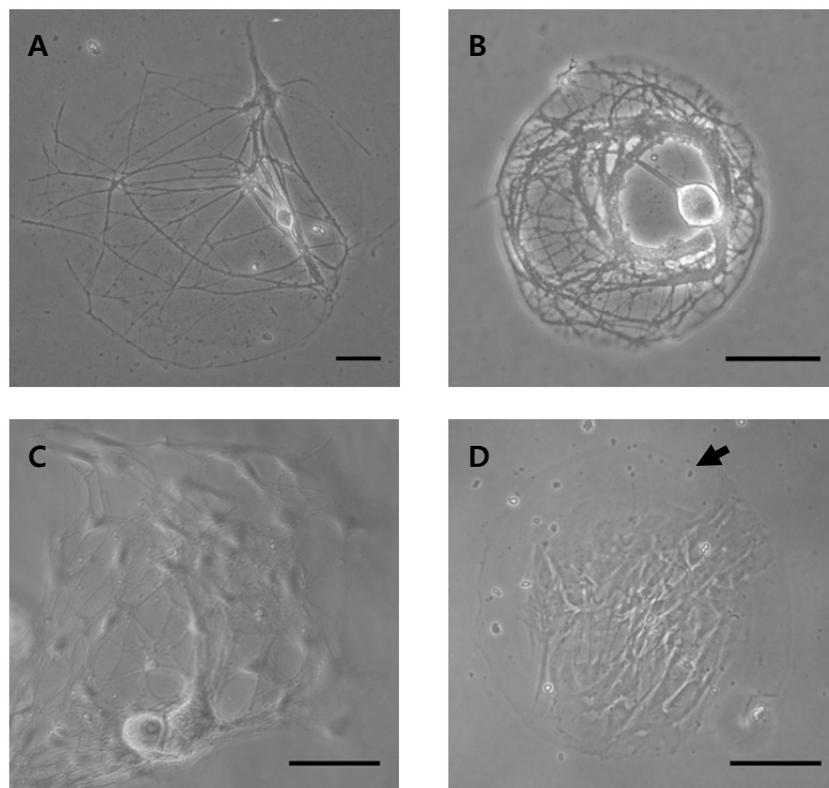
Finalmente, en el frasco atomizador, se realiza la mezcla de colágeno y el medio de cultivo RPMI 10x (ver Anexo I) y se rocía sobre los cubreobjetos pre-tratados con la solución de agarosa al 0.15% en agua bi-destilada estéril, generando una densidad media de gotas de la mezcla sobre los cubreobjetos que están en las placas de 12 pocillos. Para obtener unas gotas de colágeno adecuadas en tamaño y densidad, se debe pulverizar la mezcla a una distancia de unos 30-45cm de la placa de cultivo y se debe colocar el frasco atomizador unos 5cm más alto respecto a la

placa. El colágeno mezclado se rocía en uno o dos pulsos, evitando una pulverización excesiva (Fig. 28).



**Figura 28. Sustratos del microcultivo de neuronas**

Se dejan reposar las microgotas durante 1-2 minutos y antes de que las gotas de colágeno adquieran una tonalidad blanca por completo, que es indicativo de que el colágeno se ha secado, se añade a cada pocillo 1mL de medio de cultivo con las neuronas en suspensión. Este paso es importante porque las gotas de colágeno se deforman cuando éste se seca, pero tampoco se pueden añadir las células antes de un minuto porque la gota se puede despegar de la superficie del cubreobjetos.



**Figura 29. Imágenes de contraste de fase de diferentes tipos de microcultivos.** A) y B) Imágenes de microcultivos donde una única neurona crece sobre una gota de colágeno (SCM). Imágenes obtenidas con un objetivo a 10X (A) o 20X (B). C) Microcultivo donde una neurona se desarrolla junto a otras células no neuronales en la misma gota de colágeno (GM). D) Microcultivo de células no neuronales, donde no hay ninguna neurona. La flecha indica el contorno de la microgota de colágeno. La barra de calibración indica 100 $\mu$ m.

La placa con las neuronas recién sembradas, se deposita en un incubador a 37°C y 8% CO<sub>2</sub> y se evita la perturbación hasta el primer cambio de medio de cultivo.

#### Mantenimiento de los microcultivos neuronales:

Transcurridos dos días del establecimiento del cultivo de neuronas, se realiza un reemplazamiento parcial del medio de cultivo. Ignorando el mínimo efecto de evaporación que se puede producir por el hecho de tener la placa en el incubador, se retiran 500µL y se añaden 500µL de medio de cultivo fresco. En este cambio de medio se adicionan los factores tróficos NGF-7S y CNTF. La cantidad de los factores de crecimiento en el medio de cultivo nuevo, es la necesaria para que se alcancen una concentración de 5nM de NGF-7S y de 2nM de CNTF por pocillo. En el caso de las células tratadas con pregabalina (Laboratorios Esteve) de forma crónica, se añade la cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones finales deseadas  $\geq 0.5\mu\text{M}$  (ver resultados) optimizadas previamente en el laboratorio. En el caso de las células tratadas con el péptido de la neurexina-1 $\alpha$  (R&D Systems), la concentración final del pocillo fue  $\geq 10\text{nM}$ .

El cambio de medio se realiza cada dos días hasta un total de 18-21 días en cultivo, cuando se comienza a trabajar con las neuronas. Para disminuir la variabilidad de las respuestas entre los microcultivos, las microislas de una única neurona (SCM o autáptica) seleccionadas para ser registradas contenían una gran cantidad de procesos, con un tamaño de entre 100 y 300µm, cubriendo por completo el campo visual de una imagen de contraste de fase con un objetivo de 40 aumentos (Fig. 29).

## **1.2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES.**

Para la producción de lentivirus como herramienta de transgénesis en las neuronas, se usan puntualmente a lo largo de esta tesis, células HEK-293T. Las células HEK-293 pertenecen a una línea celular aislada de riñón embrionario humano (*Human Embryonic Kidney*). Una variante importante de esta línea celular es la 293T que contiene, además, el antígeno SV40-T, que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40. Esto permite la amplificación de plásmidos transfectados y la expresión temporal prolongada de los productos génicos deseados. Para el cultivo de esta línea celular, se emplea un medio de cultivo con la siguiente composición:

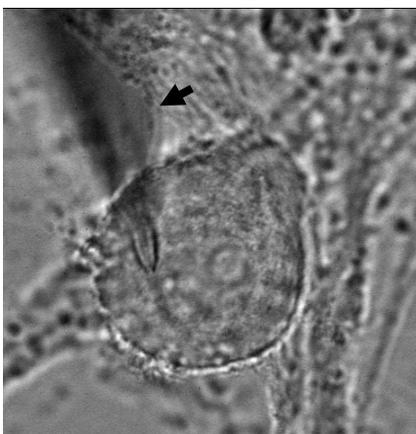
- DMEM:F12 (1:1) con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)
- 10% (v/v) FBS (Invitrogen)
- 1% (v/v) P/E (Sigma-Aldrich, ref: P0781)

El cultivo de la línea celular se realiza a partir de alícuotas de 1mL de células congeladas en nitrógeno líquido. Se encuentran crio-preservadas en un medio completo con 10% (v/v) de DMSO. La alícuota se descongela y se transfiere a 5mL de medio de cultivo con 10 % de suero y 1 % P/S contenido en una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro, y se mantiene en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se hacen pases de células, para mantener la viabilidad celular, cuando la confluencia de las células en la placa esté próxima al 90-95 %. Las células serán transferidas a placas de cultivo de 15cm de diámetro siempre que tengan un número de pases totales inferior a 23, para llevar a cabo el protocolo de producción de lentivirus (apartado 4 de en Materiales y Métodos).

## 2. ELECTROFISIOLOGÍA.

Las neuronas autápticas se presentan como un modelo de circuito neuronal en el que son presinápticas y postsinápticas en sí mismas. Esto simplifica algunas técnicas como la electrofisiología, ya que permiten generar un potencial de acción y registrar la respuesta postsináptica empleando un único electrodo, que será a la vez de estimulación y de registro.

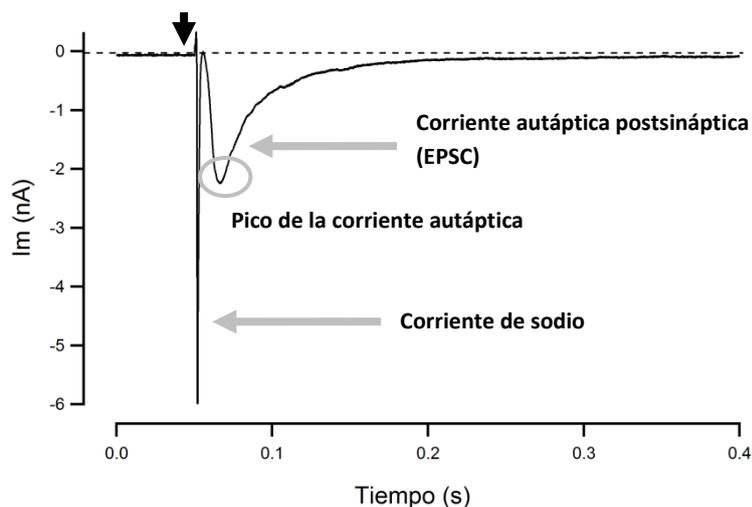
Se emplea la técnica de *Patch-Clamp* en su modalidad de fijación de voltaje (*Voltage-Clamp*). Los registros se realizan en la configuración de *whole-cell* en la que la membrana de la célula se rompe para acceder a su interior, a través de la pipeta de registro con un electrodo en su interior (Fig. 30). La pipeta contiene la solución interna (ver composición en 2.1) que dializa dentro del soma de la célula.



**Figura 30. Imagen en contraste de fase de un SCM registrado (60X).** El acceso al interior de la neurona se hace en el soma celular. Mediante una pipeta de vidrio (flecha) se genera un parche sobre la membrana y tras succiones sucesivas se consigue perforar y acceder al interior celular. Su voltaje es fijado a -60mV. La estimulación y el registro se realizaron con el mismo electrodo que se encuentra dentro de la pipeta.

## 2.1. EXPERIMENTOS DE *VOLTAGE-CLAMP*.

En los experimentos de *Voltage-Clamp*, en la configuración de *whole-cell*, el voltaje de la membrana de las neuronas autápticas es fijado a  $-60\text{mV}$ , en reposo. Cuando se aplica un pulso despolarizante, se lleva el potencial de membrana hasta  $0$  o  $10\text{mV}$  durante  $2\text{ms}$ , provocando la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje que generará un potencial de acción que evocará una respuesta sináptica, EPSC.



**Figura 31. Registro de *voltage-clamp* de una neurona autáptica.**

El potencial de acción generado por el estímulo eléctrico (flecha negra) aparece como una corriente de entrada de sodio que se propaga a través del axón. Este potencial de acción genera la consecuente corriente postsináptica autáptica que aparece con un retraso de  $10\text{ms}$ . En nuestro sistema colinérgico, esta corriente es debida a la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores postsinápticos.

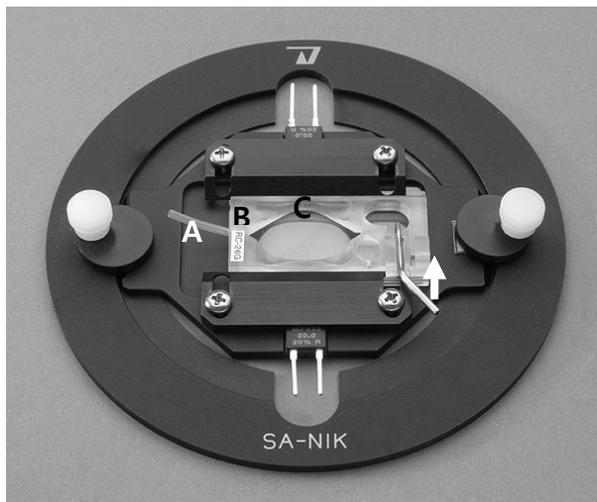
En el registro asociado a la aplicación de un estímulo despolarizante se observa (Fig. 31): *i*) una corriente debida a la entrada de sodio a través de los canales dependientes de voltaje de este ión, que inician el potencial de acción (corriente de estimulación); *ii*) una corriente de entrada,  $5\text{-}10\text{ms}$  después de la corriente de sodio, debida a la neurotransmisión, EPSCs o autáptico. La corriente autáptica se presenta como una campana de Gauss invertida, que refleja el proceso de sincronización de las sinapsis estimuladas, donde el pico de dicha corriente es el punto de máxima sincronización de la liberación de las vesículas (Stevens & Williams, 2007).

Debido a que los registros se realizan sobre el soma de la neurona y los procesos neuronales son prolongados y tortuosos, existe una limitación espacial de la fijación del voltaje (*space-clamp*) y un filtrado por el cableado axonal que reduce el flujo despolarizante por la membrana (Ulrich & Luscher, 1993), y disminuye la contribución de las sinapsis axodendríticas en la respuesta final. De esta forma en el análisis y en posteriores cuantificaciones, solamente se consideran las sinapsis axosomáticas como las contribuyentes a la corriente autáptica o EPSC.

### 2.1.1. Material.

#### Soporte para los registros:

Para llevar a cabo los registros, los cubreobjetos con microcultivos de entre 18 y 21 días de cultivo *in vitro* (DIV) se colocan en una cámara de registro (Warner Instrument, Hamden, USA, modelo RC-25F, Fig. 32B) con un orificio en la base inferior de diámetro menor al del cubreobjetos, que permite el enfoque del objetivo del microscopio (Fig. 32C) y unos orificios de entrada y salida que facilitan la perfusión de la solución externa de baño (Tabla 12). La cámara de registro va sellada con grasa a un soporte (Fig. 32A), a fin de evitar la fuga de solución externa de registro, y todo este montaje, se coloca en la platina del microscopio invertido Olympus IX-71. En el compartimento de la perfusión de la cámara, se monta un electrodo clorado que está en contacto con el baño de solución que cubre a las células y se usa como electrodo de referencia "tierra".

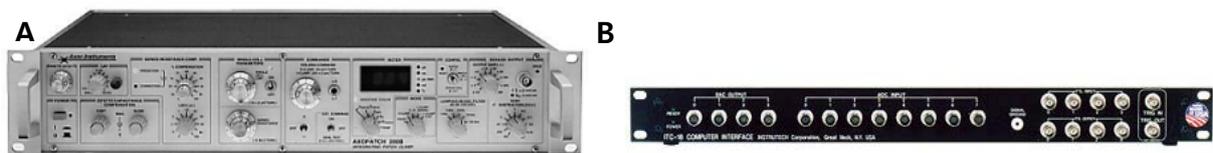


**Figura 32. Cámara y soporte de registro.** Soporte sobre el que se pone el cubreobjetos (A) en su orificio central, y sobre el que se coloca la cámara de registro (B) sellando ambas partes con una grasa que genera vacío, y quedando el cubreobjetos en medio de ambas (C). La cámara de registro contiene un compartimento central hueco que se llena de solución externa de registro, bañando las neuronas. Esta solución perfunde entrando y saliendo por unos orificios laterales (flechas) que permiten un flujo continuo.

Sobre la platina de registro se coloca un cabezal que actúa de pre-amplificador (*CV-4 Headstage, Gain X1/100, Axon Instruments, USA*). En él se encaja un soporte (*holder*) con la pipeta de registro, que contiene una solución interna (Tabla 12) y un electrodo de plata clorado, en contacto con el soporte por una clavija de oro. De dicho soporte parte un tubo que, siguiendo un circuito, permite la succión directa con la boca para generar un vacío y así realizar un sello y la posterior apertura de la membrana de la célula (*patch-clamp: paso de la configuración on-cell a whole-cell*).

### Setup de registro:

El cabezal pre-amplificador está conectado a un amplificador para magnificar la corriente eléctrica generada por las neuronas (Fig. 33A). El amplificador es un *Axopatch-1D* (Molecular Devices, CA) acoplado por una tarjeta convertidora analógico-digital ITC-18 (Fig. 33B, Instrutech, Great Neck NY, USA) al *software* WCP (University of Strathclyde, <http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page>) o MaFPC (software basado en IgorPro desarrollado por Matthew Xu-Friedman, University of Buffalo, USA).



**Figura 33. Amplificador e interfase.** A) Amplificador *Axiopatch-200B* B) Interfase ITC-18 de Instrutech que permite pasar de las señales analógicas del amplificador a la digital del *software*.

### Pipetas de registro:

Para los registros se usan pipetas de borosilicato con filamento interior, de diámetro interno y externo 0.69 y 1.2 mm respectivamente (Harvard Apparatus). La forma óptima de la punta es crucial para el establecimiento del sellado sobre la membrana de la neurona y el su mantenimiento fidedigno durante todo el registro. El aparato usado para diseñar la punta idónea para los registros es un *Micropipette puller* de forja horizontal (modelo P-97, Sutter Instruments, USA, Fig. 34).



**Figura 34. *Micropipette puller* y pipeta de registro.** A) Aparato de forja horizontal para diseñar micropipetas de registro. B) Ejemplo de una punta de una micropipeta de registro. La forma es crucial para generar un sello con la membrana de la célula, romperla y mantener la resistencia en serie durante todo el registro.

Para nuestros experimentos en la configuración *whole-cell* se prefieren las puntas convexas hacia el exterior porque mantienen la presión de una manera más óptima. La resistencia que genera la pipeta utilizada en el baño es de 3-5 M $\Omega$ .

Soluciones:

Solución externa (mM)	Solución interna (mM)
NaCl 130 mM	Gluconato potásico 130 mM
KCl 5 mM	Hepes (no semi-sodio) 10 mM
Sal de Hepes Semi-sodio 10 mM	EGTA 1 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM*	Na <sub>2</sub> ATP 3 mM
Glucosa 10 mM	NaGTP 1 mM
CaCl <sub>2</sub> 2mM*	MgCl <sub>2</sub> 4 mM*
pH 7.4 (ajustado con NaOH)	pH 7.2 (ajustado con KOH)
Ajustada a 290 mOsmol kg <sup>-1</sup> antes de añadir Glucosa.	Ajustada a 290 mOsmol kg <sup>-1</sup>
Resulta ~ 300 mOsmol kg <sup>-1</sup> tras añadir Glucosa y CaCl <sub>2</sub> .	
*Ambas a partir de soluciones comerciales a 1 mM	

Tabla 12. Soluciones de registro.

Durante los registros las neuronas se encuentran sometidas a un baño de solución externa mediante un flujo constante.

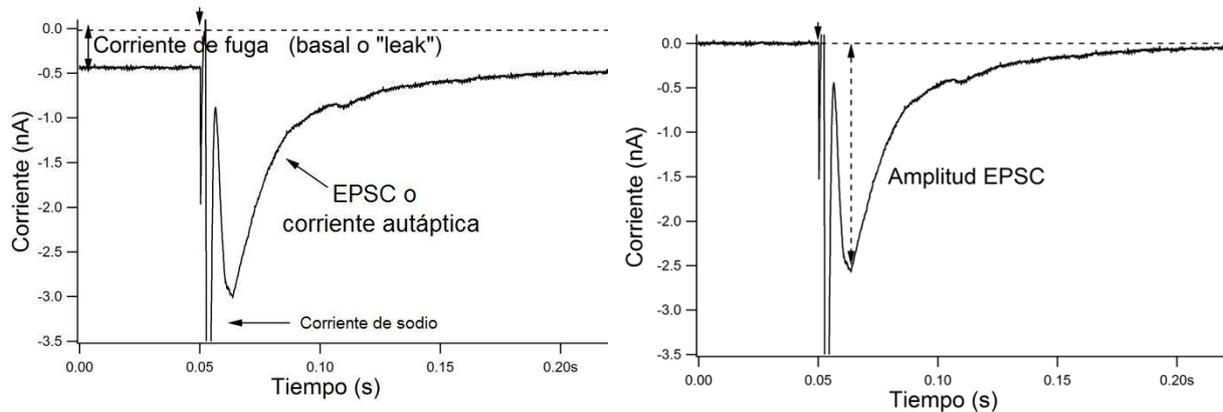
En función de los experimentos, se ha requerido el uso de diferentes sustancias directamente sobre el soma de la neurona (perfusión local) o en el flujo de perfusión de la solución externa. Estas sustancias y sus concentraciones se explican detalladamente en los capítulos de resultados correspondientes.

## 2.2. ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE *VOLTAGE-CLAMP*.

En los registros de *Voltage-Clamp* obtenemos dos tipos de respuestas en función del estudio: a) Registros de corriente evocada; b) Registros de corriente espontánea. El análisis se realiza mediante *macros* en el *software* Igor Pro 6.0 (Wavemetrics, Oregon, USA)

**i)** Registros de corriente evocada (EPSC). Todos los trazos de registros de *voltage-clamp* se representan sin la corriente de estimulación de sodio, ya que el interés reside en la respuesta autáptica evocada. Para el análisis se considera la amplitud del pico de la corriente autáptica. Previamente se substraen la corriente basal del

registro (Fig. 35). Se descartan neuronas con corrientes de fuga superiores al 10% de la corriente autáptica resultante, o mayores a 300 pA, ya que indica un mal sellado y pobre mantenimiento del voltaje en la técnica *voltage-clamp*.



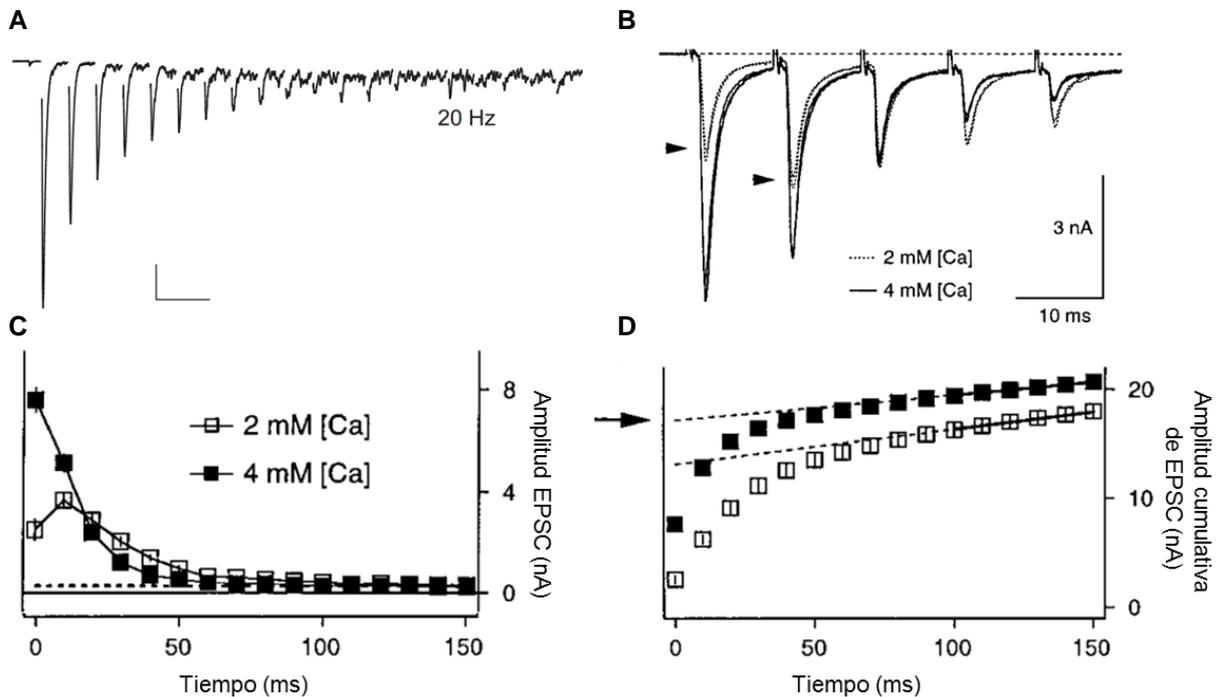
**Figura 35. Registros de *voltage-clamp* asociados a un estímulo despolarizante en un SCM antes y después de sustraer la corriente de fuga.** A) Antes de la aplicación del estímulo despolarizante (cabeza de flecha superior) existe una corriente basal que corresponde a la corriente de fuga o "leak" entre la membrana de la célula y la pipeta de registro. Tras el estímulo aparece la corriente de despolarización, de sodio (parcialmente representada), y posteriormente la corriente autáptica evocada o EPSC en forma de gaussiana invertida. B) Se sustrae la corriente de fuga o basal, llevándola al valor cero, y esto permite calcular la amplitud de la corriente autáptica evocada (línea punteada de doble cabeza de flecha).

ii) Registros de corrientes espontáneas (mEPSCs). No son evocados por un estímulo eléctrico sino respuestas espontáneas de liberación de una o varias vesículas sinápticas. Se cuantifica la amplitud de la corriente de los mEPSCs, así como su frecuencia de aparición. El valor de amplitud mínimo de un mEPSC se estima en 20 pA, que corresponde aproximadamente tres veces la desviación estándar del ruido.

### 2.2.1. Estimación funcional del RRP.

Como método para estimar el tamaño del RRP hemos utilizamos la aplicación de trenes de estímulos a alta frecuencia (Fig. 36; Schneggenburger et al., 1999). Con la estimulación reiterada el RRP se agota rápidamente y se alcanza la depresión sináptica llegando a un estado estacionario (Fig. 36). El análisis acumulativo de los EPSCs evocados respecto al tiempo, permite ajustar una función lineal al estado estacionario de la depresión, cuya extrapolación con el eje de ordenadas proporciona el valor estimado del RRP (Fig. 36D). Este mecanismo es dependiente de toda la maquinaria exocítica y por lo tanto también del calcio. Así, una probabilidad de liberación incrementada con este ión, favorece una mayor

exocitosis que conlleva una depresión mas pronunciada y una llegada al estado estacionario con anterioridad (Pérez-González et al., 2008).



**Figura 36. Estimación del tamaño del RRP mediante la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia.** A) EPSCs evocados frente a un tren de estímulos a 20 Hz en neuronas hipocámpales. Observar la depresión en la corriente tras 4-5 potenciales de acción. Barras de calibración, 500pA y 100ms. B) Diferencia en el EPSC evocado en función del  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . Aunque a 4mM la amplitud de los primeros EPSCs es mayor, se alcanza antes la depresión que a 2mM. Sinapsis del *Calyx of Held* a 100Hz. C) Medida de las amplitudes de los EPSC evocados a lo largo del tren a 100Hz de (B). D) Análisis acumulativo de los EPSC evocados en (B) y (C). El estado estacionario de la depresión permite ajustar una función lineal cuya extrapolación con el eje de ordenadas proporciona la estimación del tamaño del RRP. A modificada de (Stevens & Williams, 2007); B, C y D modificadas de (Schneppenburger et al., 1999).

En el caso de las neuronas autápticas del SCG, se estima el tamaño del RRP mediante la aplicación de un tren de estímulos entre 14-20 Hz.

### 2.3. REGISTRO DE FLUORESCENCIA SIMULTÁNEA A LA ELECTROFISIOLOGÍA.

Durante el desarrollo de esta tesis, se realizaron experimentos midiendo los cambios de fluorescencia del indicador de calcio presináptico SyGCaMP6f. SyGCaMP6f es una versión mejorada de SyGCaMP2 (Dreosti et al., 2009), donde el indicador de calcio GCaMP6f se encuentra unido a la sinaptofisina, una proteína de las vesículas sinápticas. Los registros de fluorescencia se realizaron en neuronas autápticas infectadas con lentivirus (ver apartado 4 de materiales y métodos) simultáneamente al registro electrofisiológico. De esta manera es posible visualizar la entrada de calcio presináptico y monitorizar su comportamiento durante la estimulación neuronal.

SyGCaMP6f presenta un patrón de fluorescencia difuso distribuido por toda la célula, mostrando claramente puntos donde se acumula que asumimos como terminales presinápticos (Figura 37A). Para realizar el estudio, se selecciona una región de interés de 400x400píxeles localizada alrededor del árbol dendrítico y se ajusta la ganancia a un valor de fluorescencia entre 200-250 u.a. para poder estudiar los cambios en la fluorescencia sin que se produzca saturación.

La fuente de luz corresponde a una lámpara de vapor de mercurio de 100W acoplado al microscopio (HBO 103 W/2, OSRAM), que excita a la longitud de onda de 488nm. La fluorescencia se adquiere usando un dicroico q505LP y filtros de emisión HQ535/50m (Chroma). Los objetivos utilizados son:

- LD Plan-Neofluar 40X, 0.6 NA (Zeiss), que es un objetivo de no inmersión.
- PlanApo 60X 1.45 NA, (Olympus), que es un objetivo de aceite de inmersión.

Los experimentos se iniciaron con el objetivo de 40x, montando el cubreobjetos de forma tradicional (apartado 2.1.1. de materiales y métodos). Posteriormente, para conseguir mayor resolución de imagen se utilizó un objetivo de mayor apertura numérica (NA), 1.45, y de inmersión (PlanApo 60X) en todos los experimentos de fluorescencia acoplada a la electrofisiología. Este objetivo tiene una distancia de trabajo más corta, pero colecta más luz y brinda una imagen más brillante definiendo detalles más finos. El poder de resolución obtenido viene definido por la ley de Abbe:

$$d = 1.22 \lambda / 2 n \sin \theta$$

donde d es el poder de resolución (la distancia más corta definible entre dos puntos);  $\lambda$  es la longitud de onda de la fuente de luz al pasar por el filtro de excitación; n es el índice de refracción de la interfase entre la muestra y el objetivo (aire, aceite de inmersión o agua), en este caso del aceite de inmersión que es 1.518;  $\theta$  es la mitad del ángulo de apertura; el coeficiente 1.22 / 2 es la constante de Abbe; y la apertura numérica AN = n sen  $\theta$ . Así el poder de resolución se relaciona con la apertura numérica mediante la expresión:

$$d = 1.22 \lambda / 2 AN.$$

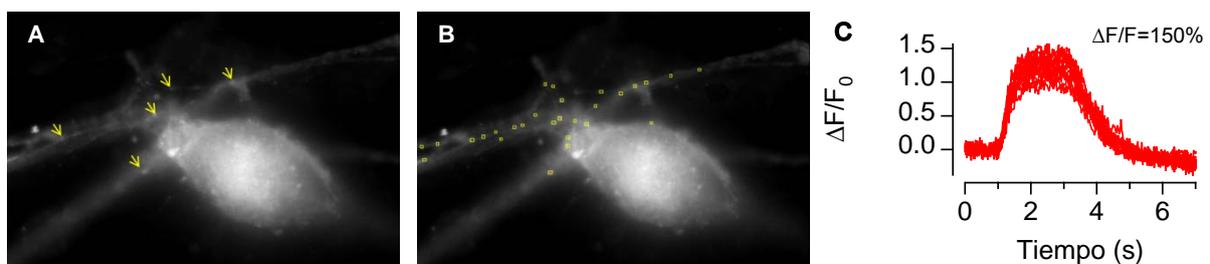
De esta manera, cuando iluminamos las células con luz azul usando el filtro de excitación 488/20 nm y utilizamos el objetivo de 40X con una apertura numérica de 0.6, obtenemos una resolución teórica de 496nm; mientras que utilizando el objetivo de inmersión de 60x con una apertura numérica de 1.45, obtenemos una resolución teórica de 205 nm, es decir, somos capaces de diferenciar en teoría distancias mínimas de 0.2 $\mu$ m entre dos puntos. Asumiendo que los puntos de

fluorescencia que definen una sinapsis tienen un diámetro de 1-1.5 $\mu$ m, se ha podido estudiar la intensidad de fluorescencia en sinapsis concretas con precisión.

Las imágenes se capturaron a 37Hz de frecuencia con la cámara EM-CCD C-9100 controlada por el *software* Hokawo (Hamamatsu). El tiempo de exposición se controla generando órdenes TTL con el software de registro y el tiempo de iluminación se ajusta con un obturador (Uniblitz) para minimizar el fotoblanqueado.

#### 2.4. ANÁLISIS DE LA FLUORESCENCIA SIMULTÁNEA A LA ELECTROFISIOLOGÍA.

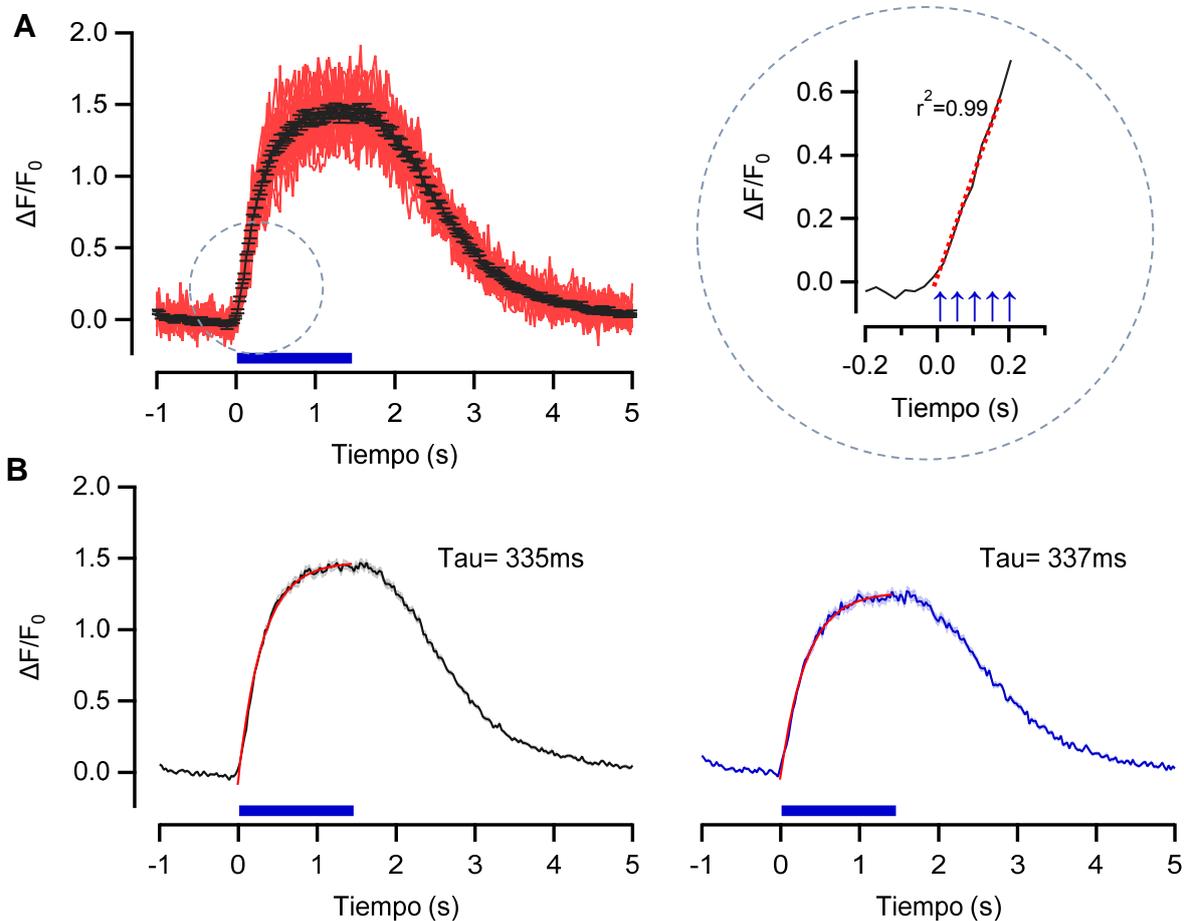
El análisis de las imágenes de las neuronas que expresan SyGCaMP6f se realiza con el programa ImageJ. Se seleccionan regiones de interés (*ROI*, *region of interest*) de 1.3 x 1.3 $\mu$ m centradas en los puntos de fluorescencia (Fig. 37B). La captura de las imágenes se lleva a cabo durante un período basal, un período de tren de estimulación de las neuronas, y un período de recuperación. El análisis de la fluorescencia se hace estudiando los cambios relativos al período basal de la fluorescencia, mostrándose los incrementos en la entrada de calcio en el terminal presináptico como cambios relativos en la fluorescencia basal de indicador SyGCaMP6f ( $F_0$ ), medidos como:  $(F-F_0)/F_0$ . Consideramos que una sinapsis responde cuando se produce un incremento en la fluorescencia mayor a dos desviaciones estándar de la fluorescencia basal (Fig. 37C).



**Figura 37. Patrón de fluorescencia del indicador SyGCaMP6f.** A) El patrón de fluorescencia de SyGCaMP6f se distribuye por toda la neurona, evidenciándose puntos discretos definidos alrededor del soma y en los procesos axodendríticos, que asumimos como posibles terminales presinápticos (indicadas en las flechas amarillas). B) Para captar los puntos donde se localizan posibles sinapsis se hace el promedio de las imágenes basales capturadas antes de comenzar la estimulación y se seleccionan las posibles regiones de interés (ROIs) con el programa ImageJ, centradas en los puntos de fluorescencia ( $\square$ ). C) Cambios relativos en la fluorescencia basal, medidos como  $(F-F_0)/F_0$ . En este caso se observa un incremento relativo respecto a la fluorescencia basal  $>150\%$ .

La comparación entre los diferentes grupos experimentales se lleva a cabo calculando: a) los cambios relativos en la fluorescencia basal,  $\Delta F/F_0$ , analizando el incremento lineal de fluorescencia ocurrido durante los primeros 200ms de estimulación (Fig. 38A) y b) midiendo la cinética del incremento en la entrada calcio.

Esta medida se obtiene a partir del valor de la constante de tiempo tau ( $\tau$ ) ajustando a una exponencial simple la fase ascendente del promedio de las curvas analizadas (Fig. 38B).



**Figura 38. Análisis de los cambios de fluorescencia del indicador SyGCaMP6f. A)** Cambios relativos en la fluorescencia basal del indicador SyGCaMP6f, medidos como:  $\Delta F/F_0$ . Durante los primeros 5 estímulos aplicados a 20Hz, los cambios relativos en la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f se ajustan a una función lineal ( $r^2=0.99$ ), generándose un incremento en la fluorescencia superior al 50% durante ese periodo de tiempo (200ms) en el ejemplo. **B)** En la misma neurona, la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia (20Hz) genera un incremento en la fluorescencia ~150% durante la primera estimulación, mientras que una segunda estimulación produce un incremento en la fluorescencia ~120%. Sin embargo, la cinética de entrada de calcio presináptico no varía. La medida se obtiene a partir del valor de la constante de tiempo tau ( $\tau$ ) tras ajustar a una exponencial simple la fase ascendente del promedio de todas las curvas analizadas. En el ejemplo, el valor de  $\tau = 335\text{ms}$  durante la primera estimulación y de  $337\text{ms}$  en el segundo caso.

### 3. INMUNOFLUORESCENCIA.

Para identificar morfológicamente la localización de las sinapsis y las proteínas que nos interesan, los SCMs previamente registrados son fijados y con ellos se realizan técnicas de inmunofluorescencia. Las neuronas que no presentan EPSCs se descartan del estudio para así asegurarnos que los SCMs estudiados presentan sinapsis funcionales. La inmunofluorescencia se realiza de la siguiente manera:

- Inmediatamente después del registro, el cubreobjetos con el microcultivo registrado se fija con paraformaldehído al 4% en PBS 1X, durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno, con solución PBS 1X a temperatura ambiente.
- Se realiza una etapa de permeabilización previa con PBS 1X y 0.3 % de Tritón-X100 durante 30 minutos en agitación suave y temperatura ambiente.
- Se realiza una etapa de bloqueo para evitar unión inespecífica de los anticuerpos usando una solución con suero de cabra (NGS) al 20 %, Tritón-X100 al 0.1% y Gelatina al 0.2% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave.
- El anticuerpo primario se incuba durante toda la noche a 4°C en una solución similar a la de bloqueo pero con 1% de NGS. Se aplica una agitación suave.
- Al día siguiente se realizan tres lavados de 10-15 minutos con solución de bloqueo a temperatura ambiente.
- Se incuba el anticuerpo secundario específico a una dilución 1:500, conjugados con fluorocromos AlexaFluor 488, AlexaFluor 555 y AlexaFluor 647 (*Molecular Probes*). Este paso se realiza en ausencia de luz, durante 1.5 horas y con una agitación suave.
- Se hacen tres lavados con una solución de 0.1% Triton-X100 en PBS 1X, y se procede al montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos, mediante medio de montaje Fluoromount (Sigma). Siempre en ausencia de luz.

Posteriormente se identifican los SCMs registrados y según el requerimiento del experimento, las muestras se procesan en:

- i) Microscopio de campo amplio Zeiss, modelo Axio Examiner.A1, acoplado a una cámara AxioCam MRc5 y el *software* AxioVision 4.7 para adquirir las imágenes.
- ii) Microscopio Confocal Espectral Leica TCS-SL y las imágenes se adquieren con el programa Leica Confocal Software (LCS), en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Las imágenes se adquieren centradas en el soma de la célula y ajustando los valores de fluorescencia a 160-210 u.a.

El procesado de todas las imágenes se lleva a cabo con el programa ImageJ.

Los anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia de SCMs son:

Anticuerpo primario	Origen	Concentración	Referencia
Anti-VAMP2 (monoclonal)	Ratón	1:1000	Synaptic System (104211)
Anti-sinaptotagmina1 (monoclonal)	Ratón	1:800	RDSystems (MAB43641)
Anti- $\alpha 2\delta$ -1 (policlonal)	Conejo	1:1000	Lifespan Biosciences (LS-B162)
Anti- $\alpha 2\delta$ -2 (policlonal)	Conejo	1:1000	Genetex (GTX54770)
Anti- $\alpha 2\delta$ -3 (policlonal)	Conejo	1:1000	Genetex (GTX16618)

Tabla 13. Anticuerpos para la inmunofluorescencia de los SCMs.

#### 4. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS (VIH-1) DE ALTO TÍTULO MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293T.

El vector pseudotipado VSV-G es la mejor elección para la mayoría de los experimentos de producción de lentivirus, tanto *in vivo* como *in vitro*. Nos basamos en el protocolo usado en el laboratorio de Didier Trono (Lausanne, Suiza).

La producción de lentivirus es la herramienta para modificar genéticamente nuestros microcultivos para que puedan expresar aquellas proteínas que nos interesan marcar o estudiar y/o aumentar la expresión de otras proteínas.

Estos virus son de segunda generación y únicamente necesitan dos vectores constitutivos, posteriormente explicados, y el vector con el/los gen/es de interés. La producción de cada tipo de virus se hace mediante la transfección de células de la línea HEK-293T (cultivo explicado en el apartado 1.2 de materiales y métodos). El protocolo está ajustado para comenzar con cinco placas de cultivo de 15cm de diámetro de células HEK-293T a una confluencia del 80%, ya que esta proporción es la que da mayor eficiencia. En el caso de necesitar más placas, se recomienda hacerlo en múltiplos de 5, de la misma forma que el resto de soluciones y componentes.

##### 4.1. Material.

###### Equipamiento:

- Campana de flujo laminar de bioseguridad II con luz UV para esterilizar
- Incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Uso exclusivo para material vírico
- 5 placas de cultivo de 15cm de diámetro estériles (TPP, Suiza)
- Tubos de centrifuga cónicos de 15 y 50mL estériles
- Filtros de 0.22 $\mu$ m de tamaño de poro estériles (ref. 99250, TPP, Suiza)
- Pipeta *Pasteur* de vidrio
- Pipeta electrónica *Pipetor*
- Frascos de cultivo de 100mL estériles

- Células HEK-293T (ATCC cat. no. SD-3515)

#### Soluciones:

- Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) con FBS 10% y P/S 1%
- Tripsina/EDTA 0.05% (Invitrogen)
- Tampón Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Stock 1X (ver apartado soluciones)
- Agua tamponada (ver apartado soluciones)
- $\text{CaCl}_2$  2.5M (ver apartado soluciones)
- Solución salina tamponada con HEPES (HeBS) 2X (ver apartado soluciones)
- Etanol 75% (v/v) en frasco difusor
- Lejía, en el matraz de los restos del aspirado

#### Plásmidos:

- pMD2.G (contiene el gen de la proteína que forma la cápsula del virus VSV G) (*Addgene plasmid #12259*. Didier Trono Lab)
- pCMVR8.74 (contiene los genes de las proteínas HIV-1 Gag, Pol, Tat y Rev) (*Addgene plasmid #22036*. Didier Trono Lab)
- El plásmido-vector de transferencia con el gen de interés (pInterés). Los plásmidos fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Leon Lagnado (<http://www.sussex.ac.uk/lifesci/lagnadolab/>) y del Dr. Timothy A. Ryan (<https://sites.google.com/site/ryanlab1/Home>) Los plásmidos usados en esta tesis para generar diferentes virus, son los siguientes:

**i)** pWPXL-SyGCaMP6f. Se utiliza el plásmido pWPXL (*Addgene plasmid #12257*. Didier Trono Lab) donde se clonó la secuencia codificante de SyGCaMP6f reemplazándola por la EGFP en los sitios de corte BamHI/NdeI. SyGCaMP6f es un indicador de calcio fluorescente presináptico al estar unido el indicador de calcio GCaMP6f a una proteína de las vesículas sinápticas, la sinaptofisina.

**ii)** pWPXL-CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Se utiliza el plásmido pWPXL donde se clonó la secuencia codificante de CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Addgene plasmid #26575*: Diane Lipscombe Lab) reemplazándola por la EGFP en los sitios de corte PmeI/Spel. También puede utilizarse el plásmido-vector pWPT-EGFP. En la tesis utilizamos el plásmido-vector pWPXL porque es un vector que da unos niveles de expresión más altos.

iii) pWPI-CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Se utiliza el plásmido pWPI (*Addgene plasmid* #12254. Didier Trono Lab) donde se clonó la secuencia CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 upstream de la secuencia IRES del vector, en el sitio de corte Pmel.

iv) Otros plásmidos vectores se utilizaron durante esta tesis pero no se emplearon para los resultados sólidos de ella. Estos son los siguientes: pWPT-syphy-GFP (codifica para la proteína sinaptofisina unida a la proteína fluorescente GFP), pWPT- VAcHT-pHluorin y pWPXL-VAcHT-pHluorin (codifica para el transportador vesicular de la acetilcolina unida a la phluorina, un marcador de fluorescencia dependiente del pH, que actúa como el indicador de la infección).

#### Precauciones:

Este protocolo requiere que los tubos abiertos que contienen material vírico siempre sean manipulados dentro de la campana de flujo laminar. Solamente pueden ser extraídos de la campana cuando están cerrados y se han pulverizado con etanol al 75% (v/v). Los restos sólidos y material plástico saldrán de la campana de flujo con etanol y se depositarán en un contenedor azul indicativo de material infeccioso. Todo el líquido aspirado debe ir a un matraz relleno de lejía. Cuando la lejía ya no es de color amarillo, el líquido del matraz debe ser transferido a un recipiente de plástico, perfectamente cerrado y depositado en un contenedor azul, como material muy infeccioso. La campana de flujo debe ser limpiada con etanol al 75% varias veces en cada uso. La utilización de doble guante es aconsejable. Y la bata, exclusiva para el manejo de material vírico, debe ser lavada y autoclavada al finalizar el proceso. Se aconseja utilizar una sala especial para la producción de lentivirus, y un incubador específico para material vírico.

#### **4.2. Procedimiento.**

##### 1<sup>er</sup> día:

- Se plantan aproximadamente  $11 \cdot 10^6$  células HEK-293T/placa de 15cm diámetro, el día antes de la transfección. Se mantienen en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Idealmente las células deben estar al 80% de confluencia el día de la transfección. El medio de cultivo es DMEM al 10% FBS y 1% de P/S. No usar células HEK-293T que están en cultivo más de 30 pases.

2<sup>do</sup> día:

- Dos o tres horas antes de la transfección, se reemplaza el medio de cultivo y se hacen tres lavados con PBS 1X para quitar todo resto del medio anterior que contenía antibiótico.
- Se añaden 22.5mL/placa de 15cm de diámetro de DMEM al 10% FBS sin antibiótico.
- En un tubo de 50mL, se ajusta la concentración de ADN de todos los plásmidos: pMD2G, pInterés, pCMVR8.74 a 1mg/mL en tampón TE, pH 8.0. Esto es:

Preparar 3.3mL de TE 0.1X y 1.75mL de agua tamponada

112.5µg pInterés

39.5µg pMD2G

73µg pCMVR8.74

- Añadir a este tubo con los plásmidos, 565µL de CaCl<sub>2</sub> 2.5M y mezclar muy bien pipeteando o mediante un agitador. A este tubo lo llamaremos Tubo A.
- En un tubo de 50mL colocamos 5.7mL de HeBS 2X. A este tubo lo llamaremos Tubo B.
- Adaptamos la pipeta *Pasteur* de vidrio a la pipeta electrónica *Pipetor* y emitimos presión positiva (expulsamos aire) dentro de la solución de HeBS del Tubo B, generando un burbujeo constante.
- Mientras se burbujea vigorosamente la solución del Tubo B, con una pipeta de 1mL se va depositando gota a gota, el *mix* del Tubo A sobre el Tubo B.

El movimiento vigoroso indicado en los dos pasos anteriores favorece la formación de un precipitado fino óptimo para la posterior transfección.

- Una vez pipeteada, gota a gota, toda la solución del Tubo A sobre el B, se deja el precipitado a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar, cerrado, al menos 5 minutos pero no exceder de 30 minutos.
- Añadir gota a gota 2.25mL del precipitado / placa de 15cm de diámetro donde están las HEK-293T. Cada gota sobre el medio de cultivo generará un color blanco. Mover en forma de cruz la placa mientras se van añadiendo las gotas por toda la superficie, hasta que el medio recupere un color rojo uniforme.
- Incubar las placas toda la noche a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en un incubador específico para el uso de material infectado.

3<sup>er</sup> día:

- Temprano, aspirar el medio de las placas y añadir lentamente 14mL de DMEM al 10% FBS y 1% P/S fresco/placa de 15cm de diámetro, precalentado a 37°C.

Llevar cuidado en el cambio de medio ya que, en este paso, las células HEK-293T tienen una alta tendencia a desengancharse.

La señal de fluorescencia se puede comprobar en este punto en un microscopio si el plásmido vector con el gen de interés también codifica para una proteína fluorescente (ej. GFP)

La transfección debe realizarse tarde el segundo día, y el medio debe ser cambiado temprano la mañana siguiente. Es necesario este cambio de medio ~16 horas después de la adición del ADN.

- Incubar 8 horas.
- Recolectar el medio de cultivo de cada placa de 15cm de diámetro a un tubo de centrífuga de 50mL. Cerrar los tubos y pulverizarlos con etanol al 75 % (v/v) antes de sacarlos de la campana de flujo laminar. Mantener estos sobrenadantes a 4°C.
- Añadimos otros 14mL de medio DMEM al 10% de FBS y 1% de P/S, precalentado a 37°C, a cada placa e incubar durante otras 8-12 horas. Tras este período recolectar los sobrenadantes de las placas y pasarlos a tubos de 50mL. El sobrenadante puede ser recolectado dos o tres veces, cada 8-12 horas. Mantenerlos conservados a 4°C mientras dure el período de recogida.

4<sup>o</sup> día:

- Al finalizar las recogidas de los medios, los tubos con los volúmenes perfectamente calibrados, se centrifugan durante 5 minutos a 500g (~1800 r.p.m.) y a 4°C para sedimentar restos celulares y desechos.

Una vez centrifugados, los sobrenadantes son recolectados y se desechan los sedimentos.

- Se filtran los sobrenadantes recolectados y centrifugados usando filtros de un calibre de 0.22µm de unidad de poro.

El filtrado puede ser conservado a 4°C durante 5-7 días, no más tiempo.\*

- Se alícuota el filtrado resultante en tubos *ependorf* en cantidades de 1mL, y se conserva a -80°C.

\*Los ciclos de congelado/descongelado reducen fuertemente el título de las soluciones víricas. Por lo tanto, se aconseja usarlas cada vez que se descongele una alícuota y el resto sobrante desecharlo en un contenedor de material infeccioso.

Para el desarrollo de esta tesis no fue necesario concentrar las soluciones víricas debido al bajo número de células presentes en la técnica de microcultivo. Sin embargo, y en caso de ser necesario, los sobrenadantes resultantes de la centrifugación y del filtrado pueden ser concentrados y calcular el título real de la solución vírica, M.O.I (del inglés *Multiplicity of infection*). Este término se corresponde con el número de virus que son necesarios para infectar un número de células, dianas del virus, en una placa. Así, se reduce la variabilidad y se ajusta a un nivel infección reproducible cada vez que se realice el experimento.

## **5. INFECCIÓN CON LENTIVIRUS DE MICROCULTIVOS DE NEURONAS.**

La mayoría de los lentivirus utilizados en esta tesis codifican para la expresión de una proteína fluorescente, asegurando así que los microcultivos han resultado infectados (control de infección).

Las neuronas se infectan cuando están ~12-14DIV. Se utiliza esta fecha ya que la fluorescencia como control de infección se observa con cierto nivel de expresión aproximadamente 5-6 días después. Puesto que las neuronas son registradas entre los días 17-21DIV nos aseguramos encontrar, durante estos días, el fenotipo deseado. La puesta a punto en el laboratorio de este protocolo de infección sobre microcultivos de neuronas, se determinó después de numerosas pruebas para averiguar el mayor nivel de expresión o reducción de proteína, según sea el caso. Aun reproduciendo las mismas condiciones, observamos variabilidad tanto entre los diferentes cultivos infectados, como en un mismo cultivo y un mismo pocillo. Las neuronas ofrecieron diferentes valores de expresión, lo cual fue determinante en nuestros resultados para observar el fenotipo en función de los diferentes niveles de expresión de la/s proteína/s estudiada/s y poder establecer relaciones significativas. El proceso de infección se lleva a cabo con las mismas medidas de seguridad explicadas en el protocolo de producción de lentivirus.

## 5.1. Procedimiento.

### 1<sup>er</sup> día:

i) Las soluciones que contienen los lentivirus están alicuotadas y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se utiliza 1 alícuota de 1mL de solución vírica de alto título por cada dos pocillos de una placa de cultivo, de doce, de neuronas. Así, se extraen del congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  las alícuotas de lentivirus necesarias y se dejan descongelar pausadamente dentro de la campana de flujo laminar.

ii) Los microcultivos de neuronas se encuentran sembrados en placas de cultivos de 12 pocillos. Cada pocillo contiene 1mL de medio de cultivo. Cuando las alícuotas de los virus están cuasi descongeladas, se extrae 0.5mL de medio de cultivo de cada pocillo de la placa de las neuronas. A continuación, se coloca 0.5mL de solución conteniente del lentivirus requerido a cada pocillo de neuronas.

iii) La placa con las neuronas y los virus se coloca en un incubador, específico para el manejo de material infectado, a  $37^{\circ}\text{C}$  y 8% de  $\text{CO}_2$  durante toda la noche.

### 2<sup>do</sup> día:

iv) A la mañana siguiente, se aspira el medio de cada pocillo infectado y se reemplaza por medio de cultivo fresco para las neuronas (ver medio de cultivo en apartado 1 de materiales y métodos).

v) Una vez reemplazado el medio de infección por medio fresco de cultivo, la placa de neuronas puede ser incubada con normalidad en un incubador adecuado para cultivos primarios (ver apartado 1 de materiales y métodos).

## 6. ENSAYO DE UNIÓN A RADIOLIGANDO.

Para los experimentos de *binding* nos basamos en el protocolo establecido por Suman-Chauhan N. y colaboradores (Suman-Chauhan et al., 1993). Los ensayos de *binding* son la herramienta que utilizamos para estudiar la competición entre varios compuestos por una diana específica, en nuestro caso la subunidad  $\alpha 2\delta-1$ .

### 6.1 Material.

#### Equipamiento

- Homogenizador Potter-Elvehjem (Braun).
- Centrífuga
- Placas 96 pocillos (Corning)
- Placas 384 pocillos (Corning)

- Placa de 96 pocillos provista de filtros GFC (*Multiscreen HTS*, Millipore)
- Placa de 384 pocillos provista de filtros GFC (*Multiscreen HTS*, Millipore)
- Aparato de filtración (*Vacuum Manifold Station*, Millipore)
- Contador de centelleo líquido de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer)
- Células CHO con el canal humano Cav2.2 clonado de forma estable (*Human Ca<sub>v</sub>2.2/β<sup>3</sup>/α<sup>2</sup>δ Calcium Channel Cell Line CT6159*, Chantest)

### Soluciones

- Tampón Tris-HCl (5mM, EDTA 5mM, pH 7.4)
- Tampón de *binding*, Hepes-KOH (50mM, pH 7.4)
- [<sup>3</sup>H]-gabapentina
- Solución de polietilenimina (PEI) al 0,5%
- Líquido de centelleo (*Ecoscint H*, National Diagnostic)

### **6.2 Procedimiento.**

Los ensayos de *binding* se realizan siguiendo protocolos de Nirmala S.Ch. et al., (1993).

#### **i) Preparación de la membrana**

Los pellets congelados procedentes de células CHO clonadas de forma estable con el canal de calcio humano Ca<sub>v</sub>2.2 (*Human Ca<sub>v</sub>2.2/β<sup>3</sup>/α<sup>2</sup>δ Calcium Channel Cell Line CT6159*, Chantest) se resuspenden en tampón frío Tris-HCl (5mM, EDTA 5mM, pH 7.4). La solución se homogeniza en un homogenizador Potter-Elvehjem (Braun) a 600rpm (10 pulsos) y a continuación se centrifuga a 1.000g durante 10min. El sobrenadante se decanta y el pellet resultante se descarta. La solución de membrana se centrifuga a 20.000g durante 30min a 4°C. El sobrenadante se decanta y el pellet de membrana resultante se congela a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína se determina siguiendo el método descrito por Lowry et al., (Lowry et al., 1951).

#### **ii) Incubación**

-Placas de 96 pocillos: La incubación se lleva a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano en el tampón de *binding*, Hepes-KOH 50mM, pH 7,4. Cada pocillo contiene 25μL de [<sup>3</sup>H]-gabapentina, cuya concentración final es de 15nM, y 25μL de la suspensión de membrana. El volumen final del ensayo es de 250μL y la cantidad final de proteína por pocillo es de 3-4μg. El *binding* no específico se

define por la adición de pregabalina a una concentración final de 10 $\mu$ M en el medio. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora.

-Placas de 384 pocillos: La incubación se lleva a cabo en placas de 384 pocillos de fondo plano en el tampón de *binding*, Hepes-KOH 50mM, pH 7,4. Cada pocillo contiene 25 $\mu$ L de [3H]-gabapentina a una concentración final de 15nM y 25 $\mu$ L de la suspensión de membrana. El volumen final del ensayo es de 100 $\mu$ L y la cantidad final de proteína por pocillo es de 3-4 $\mu$ g. El *binding* no específico se define por la adición de pregabalina a una concentración final en el medio de 10 $\mu$ M. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora.

### iii) Filtración

-Placas de 96 pocillos: 200 $\mu$ L de la mezcla de reacción se transfieren a una placa Millipore de 96 pocillos provista de filtros GFC (*Multiscreen HTS, 96-well FC*, Millipore), previamente tratada con 200 $\mu$ L de una solución de polietilenimina (PEI) al 0,5%. Se filtra (*Vacuum Manifold Station*, Millipore) y se lava tres veces con 200 $\mu$ L de tampón de lavado frío (Tris-HCl 50mM, pH 7.4).

-Placas de 384 pocillos: 85 $\mu$ L de la mezcla de reacción se transfieren a una placa Millipore de 384 pocillos provista de filtros GFC (*Multiscreen HTS, 384 well FC*, Millipore), previamente tratada con 100 $\mu$ L de una solución de polietilenimina (PEI) al 0,5%. Se filtra (*Vacuum Manifold Station*, Millipore) y se lava tres veces con 100 $\mu$ L de tampón de lavado frío (Tris-HCl 50mM, pH 7.4).

### iv) Lectura de la radioactividad

-Placas de 96 pocillos: Las placas se dejan secar a 60°C durante 1h y posteriormente se dispensan 30 $\mu$ L de líquido de centelleo (*Ecoscint H, National Diagnostics*) en cada uno de los pocillos. Después de dicha adición, las placas se dejan equilibrar durante toda la noche. La radiactividad unida se determina mediante la lectura de la placa en un contador de centelleo líquido de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer).

-Placas de 384 pocillos: Las placas se dejan secar a 60°C durante 2h y posteriormente se dispensan 30 $\mu$ L de líquido de centelleo (*Ecoscint H, National Diagnostics*) en cada uno de los pocillos. Después de dicha adición, las placas se dejan equilibrar durante toda la noche. La radiactividad unida se determina mediante la lectura de la placa en un contador de centelleo líquido de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer).

#### v) Análisis de los resultados

El contador de centelleo nos da un número de cuentas por minuto (cpm) para cada pocillo. El análisis de los resultados permite calcular la unión específica por sustracción de la unión No específica (NSB) de la unión total (TB) y calcular el % de inhibición para cada compuesto testado por duplicado. En el caso de los ensayos de curvas de inhibición, a partir de los resultados se pueden obtener el valor de la constante inhibitoria 50, IC<sub>50</sub> (nM) y de la constante de inhibición K<sub>i</sub> (nM).

Los porcentajes de unión (Específica, No Específica y Total) para cualquier compuesto y concentración se calculan según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Compuesto-NSB}}{\text{Binding específico}} \times 100$$

La contante de Inhibición (K<sub>i</sub>) se calcula a partir de la IC<sub>50</sub> de acuerdo con la ecuación de Cheng-Prussosof (Cheng & Prussosof, 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

En la cual [L] es la concentración de radioligando, determinada experimentalmente a partir de la lectura de las cuentas totales (dpms) usando la actividad específica del radioligando y su constante de disociación, K<sub>d</sub>.

El valor histórico de la constante de disociación del radioligando [<sup>3</sup>H]-gabapentina es 9 nM.

### 7. ENSAYO DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO.

Los ensayos de movilización de calcio permiten el cribado de alto rendimiento de compuestos bloqueantes de canales iónicos. En este tipo de ensayo se necesita una línea celular recombinante que sobreexpresa el canal iónico que queremos caracterizar farmacológicamente, en nuestro caso el canal de calcio voltaje-dependiente Cav2.2. La actividad funcional de los compuestos se determina por sus efectos inhibitorios sobre la entrada de calcio a través del canal después de despolarizar la membrana plasmática con un estímulo, el KCl. Las respuestas de movilización de calcio se evalúan midiendo la intensidad de fluorescencia de la señal de calcio en presencia de un indicador fluorescente de calcio (*Calcium6*, Molecular Devices) utilizando un lector de fluorescencia (FDSS/μCELL, Hamamatsu). Además,

la coexpresión del canal rectificador interno de potasio Kir2.1, en la misma línea celular que sobreexpresa el canal Cav2.2 (HEK-293 Cav2.2/ $\beta$ 3/ $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Kir2.1) permite controlar el potencial de membrana y por lo tanto el estado conformacional del canal Cav2.2, variando la concentración extracelular del potasio. Este hecho permite evaluar moléculas bloqueantes del canal estado-dependientes (Vortherms, et al., 2011).

### 7.1 Procedimiento.

La línea celular HEK-293 que expresa de forma estable el canal de calcio humano Cav<sub>v</sub>2.2/ $\beta$ 3/ $\alpha$ 2 $\delta$ 1 y el canal rectificador interno de potasio Kir2.1 (#CT6210, ChanTest) se cultiva en medio de cultivo completo DMEM:F12(1:1) +10%FBS(v/v) +1%P/E(v/v) suplementado con los antibióticos de selección: blasticidina (5 $\mu$ g/mL), geneticina (500 $\mu$ g/mL), higromicina (40 $\mu$ g/mL) y zeocina (100 $\mu$ g/mL). Las células se mantienen en flasks de cultivo (T175/225) en el incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se realizan pases cuando las células están a una confluencia ~80% para mantener la viabilidad celular. La coexpresión del canal rectificador interno de potasio (Kir2.1) permite controlar el potencial de membrana y por lo tanto el estado conformacional del canal Cav<sub>v</sub>2.2, variando la concentración extracelular del potasio (Vortherms et al., 2011). El cribado de la quimioteca se realizó en el estado de reposo (cerrado) del canal.

#### 1<sup>er</sup> día:

- 24 horas antes de realizar el ensayo fluorescente de movilización de calcio, se siembran las células en placas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (20.000células/pocillo) en medio sin los antibióticos de selección, añadiendo 1  $\mu$ g/mL de tetraciclina para inducir la expresión de los canales Cav<sub>v</sub>2.2 y Kir2.1. El día del ensayo las células han de estar 100% confluentes.

#### 2<sup>do</sup> día:

- El día del ensayo se diluye el indicador fluorescente de calcio (*Calcium6*, Molecular Devices) en el tampón de ensayo suplementado con 2,7mM probenecid y 0.5% BSA. Una vez preparado el *Calcium6*, retiramos el medio de cultivo poniendo especial cuidado en no levantar las células de los pocillos. Acto seguido, añadimos 10 $\mu$ L/pocillo del indicador de calcio en las placas con

el dispensador automático *Multidrop* y guardamos las placas en el incubador durante 30min a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

- A continuación, se añaden los compuestos de la quimioteca en las placas (5µL/pocillo). Los compuestos se diluyen a partir de un stock (10mM) en el tampón de ensayo para que tengan una concentración final en el pocillo de 10µM y se incuban durante media hora a temperatura ambiente protegidos de la luz.
- En el siguiente paso se activan los canales de calcio voltaje-dependientes Ca<sub>v</sub>2.2 añadiendo 25µL/pocillo del tampón de estimulación. La concentración de K<sup>+</sup> de estimulación final es de 38mM. La dispensación del tampón de estimulación se realiza con el lector de fluorescencia FDSS/ µCELL (Hamamamtsu).
- La lectura de la fluorescencia se realiza a una frecuencia de 10Hz con el lector fluorescencia FDSS/µCELL (Hamamatsu) durante 1 minuto antes de la adición del tampón de estimulación y durante los 3 minutos posteriores a la adición del tampón de estimulación.

Pasos	Parametros	Valores	Descripción
1	Sembrar las células	50µL	HEK-293 Cav2.2/β3/α2δ1 Kir2.1
2	Adición Calcium6	10µL	Calcium 6
3	Adición compuestos o controles	5µL	10µM; ω-CTX 0.1µM
4	Estimulación	25µL	38mM KCl
5	Lectura del ensayo	480nm; 540nm	Excitación; emisión

Notas:

1. 20.000células/pocillo; placas 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina; incubación durante un día a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.
2. Eliminar el medio de cultivo y añadir el indicador fluorescente de calcio intracelular *Calcium 6* durante 30min a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. *Calcium 6* diluido en el tampón de ensayo. A continuación la placa se deja a RT 5min.
3. Compuestos preparados a partir de un stock 10mM (100% DMSO) en el tampón de ensayo, incubados durante 30min. ω-CTX preparado a partir de un stock 1mM en agua.
4. KCl añadido al tampón de ensayo para alcanzar la concentración final indicada.
5. FDSS/µCELL Hamamatsu (*Functional Drug Screening System*). Lectura a 10Hz.

**Tabla 14.** Resumen de los principales pasos llevados a cabo durante el ensayo fluorimétrico de HTS de movilización de calcio.

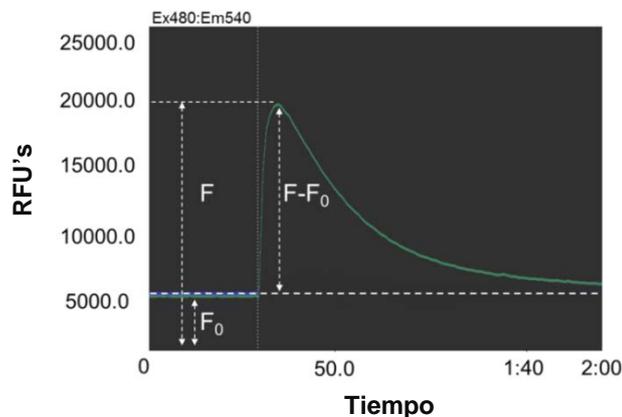
Tampón de ensayo	Tampón de estimulación
NaCl 140 mM	NaCl 80.8 mM
KCl 1 mM	KCl 60.2 mM
CaCl <sub>2</sub> 0.5mM	CaCl <sub>2</sub> 0.5mM
MgCl <sub>2</sub> 1 mM	MgCl <sub>2</sub> 1 mM
Hepes 10 mM	Hepes 10 mM
Glucosa 10 mM	Glucosa 10 mM
pH 7.4 (ajustado con NaOH)	pH 7.4 (ajustado con KOH)

\*Concentraciones utilizadas en el ensayo para mantener a los canales Cav2.2 en el estado de reposo

**Tabla 15. Soluciones utilizadas en el ensayo de HTS.**

## 7.2 Análisis de datos

Análisis de las respuestas de fluorescencia. En el ensayo de fluorimetría con el indicador *Calcium6* obtenemos una señal de fluorescencia que se corresponde con el flujo de calcio que entra en las células cuando se activan los canales de calcio voltaje-dependientes Ca<sub>v</sub>2.2 debido a la estimulación con una alta concentración de K<sup>+</sup>. El sistema de detección utilizado (FDSS/μCELL, Hamamatsu) proporciona los valores basales y máximos de la fluorescencia obtenidos, permitiendo analizar la actividad máxima de los canales y los cambios de fluorescencia (inhibición en la entrada de calcio) que genera cada compuesto, medidos a partir de la substracción de la fluorescencia basal sobre la fluorescencia total (F-F<sub>0</sub>).



**Figura 39. Ensayo de movilización de Ca<sup>2+</sup>.** Flujo de calcio evocado por un estímulo con una alta concentración de K<sup>+</sup> (38mM). Los cambios en la fluorescencia (RFU's, acrónimo del inglés *Relative Fluorescent Units*) indican la actividad del canal de calcio Ca<sub>v</sub>2.2. El análisis de las respuestas se realiza substrayendo la fluorescencia basal sobre la fluorescencia total (F-F<sub>0</sub>).

Análisis de datos. La calidad del ensayo de HTS viene determinada a través de dos parámetros: el ratio S/B (del inglés, *signal-to-background* ratio) y el valor del factor Z' (Zhang et al., 1999). Concretamente, en el ensayo de movilización de calcio el ratio S/B mide la diferencia entre el cambio de fluorescencia (RFU's) obtenido con el control positivo, relacionado con la activación máxima del canal de calcio; y el valor del cambio de fluorescencia del control negativo, relacionado con la inhibición total de la entrada de calcio en presencia de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA. El valor del factor Z' es un parámetro estadístico que tiene en cuenta la variabilidad tanto en la medida de las muestras, de la fluorescencia basal y del rango dinámico de la señal. Se define en términos de cuatro parámetros: las medias ( $\mu$ ) y las desviaciones estándar ( $\sigma$ ) de los controles positivos y negativos. En un ensayo prototípico de HTS, las placas de compuestos con valores del factor Z' superiores a 0.5 se consideran validadas. Por el contrario, las placas con un valor inferior a 0.5 no son validadas y se criban nuevamente sobre la diana seleccionada.

i) ratio S/B= Media control positivo / Media control negativo\*

\*Control positivo: Activación máxima del canal  $Ca_v2.2$

\*Control negativo: Inhibición total del canal  $Ca_v2.2$  con la  $\omega$ -conotoxina GVIA

ii) Valor factor Z':

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma \text{ positivo} + \sigma \text{ negativo})}{(\mu \text{ positivo} - \mu \text{ negativo})} *$$

Factor Z'	Calidad del cribado/detección
1	Ensayo ideal
$1 > Z \geq 0.5$	Ensayo excelente. Si $\sigma + = \sigma -$ , 0.5 es equivalente a la separación de 12 $\sigma$ entre la media+ y la media-
$0.5 > Z > 0$	Ensayo marginal
$< 0$	Cribado es imposible. Los controles positivos y negativos se solapan

Tabla 16. Categorización de la calidad de un ensayo de cribado utilizando el factor Z' (Modificado de Zhang et al., 1999).

## 8. WESTERN BLOT

- **Preparación de la muestra.** Los lisados de proteína total se obtienen a partir de cultivos masivos de neuronas (~40.000neuronas/placa) extraídas del ganglio superior cervical de crías de rata (P0-P2) que se mantienen en cultivo durante ~18-21 días en placas de 10cm de diámetro. Las placas son rociadas con colágeno, utilizado como substrato de crecimiento de las neuronas, las cuales se mantienen en cultivo de igual forma que los microcultivos. Una vez transcurridos los 18-21días, las placas se lavan con PBS-1X frío, se añaden 200 $\mu$ L de tampón

RIPA por placa (ver Anexo soluciones), se raspa el contenido celular y se recoge en un tubo eppendorf, en hielo. A continuación se sonica 5 veces la suspensión celular (ciclo 0.5 y amplitud 80%) y se pasa todo el lisado 3 veces por una jeringuilla de 29G. Después se centrifugan las muestras a 14000rpm a 4°C y se guardan los sobrenadantes a -20°C hasta el día del ensayo. Una parte del lisado (10-20µL) se utiliza para determinar la concentración de proteína a través del método descrito por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951) empleando el kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific).

- **Immunoblotting.** El día del ensayo se diluyen 25µg de cada muestra en tampón Laemmli en condiciones no reductoras y se cargan las muestras en un gel al 10% de acrilamida-bis (Bio-Rad). Las proteínas se separan por electroforesis durante 1h a 20mA y posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa durante 2h a 100V y a 4°C. A continuación se bloquean los sitios inespecíficos de la membrana con leche desnatada al 5% en solución salina tamponada con Tris y 0.1% de *Tween 20* (T-TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incuba el anticuerpo primario contra la proteína  $\alpha 2\delta$  en albúmina de suero bovino (BSA) al 3% durante toda la noche a 4°C (Tabla 14). Al día siguiente se incuba el anticuerpo secundario conjugado con HRP en leche desnatada al 5% con T-TBS durante 1h y 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se revelan las membranas añadiendo 1mL del substrato quimioluminiscente (*Luminata<sup>TM</sup> Crescendo Western HRP Substrate*, Merck Millipore) durante 1 minuto y se captura la señal quimioluminiscente en el revelador automático de luz ultravioleta *Amersham<sup>TM</sup> imager 600* (GE Healthcare).

Anticuerpo primario	Origen	Concentración	Referencia
Anti- $\alpha 2\delta$ -1 (policlonal)	Conejo	1:500	Lifespan Biosciences (LS-B162)
Anti- $\alpha 2\delta$ -1 (policlonal)	Conejo	1:500	Sigma (SAB2107922)
Anti- $\alpha 2\delta$ -1 (policlonal)	Conejo	1:500	Genetex (GTX16607)
Anti- $\alpha 2\delta$ -2 (policlonal)	Conejo	1:500	Genetex (GTX54770)
Anti- $\alpha 2\delta$ -3 (policlonal)	Conejo	1:500	Genetex (GTX16618)
Anticuerpo secundario	Origen	Concentración	Referencia
Anti-conejo HRP	Cisne	1:2000	Dako (P0217)

**Tabla 17. Anticuerpos utilizados para la detección de las diferentes isoformas de la proteína  $\alpha 2\delta$  en los SCMs mediante la técnica de Western Blot.**

## 9. ESTADÍSTICA

Los datos promedio se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el software InStat (GraphPad) y Excel. La comparación entre dos grupos experimentales llevó a cabo mediante la prueba t de Student. Cuando se realizaron comparaciones entre más de dos grupos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el análisis de comparaciones múltiple de Dunn. El nivel de significación se estableció en  $p < 0.05$  y se indica para cada grupo experimental en las figuras.



# RESULTADOS

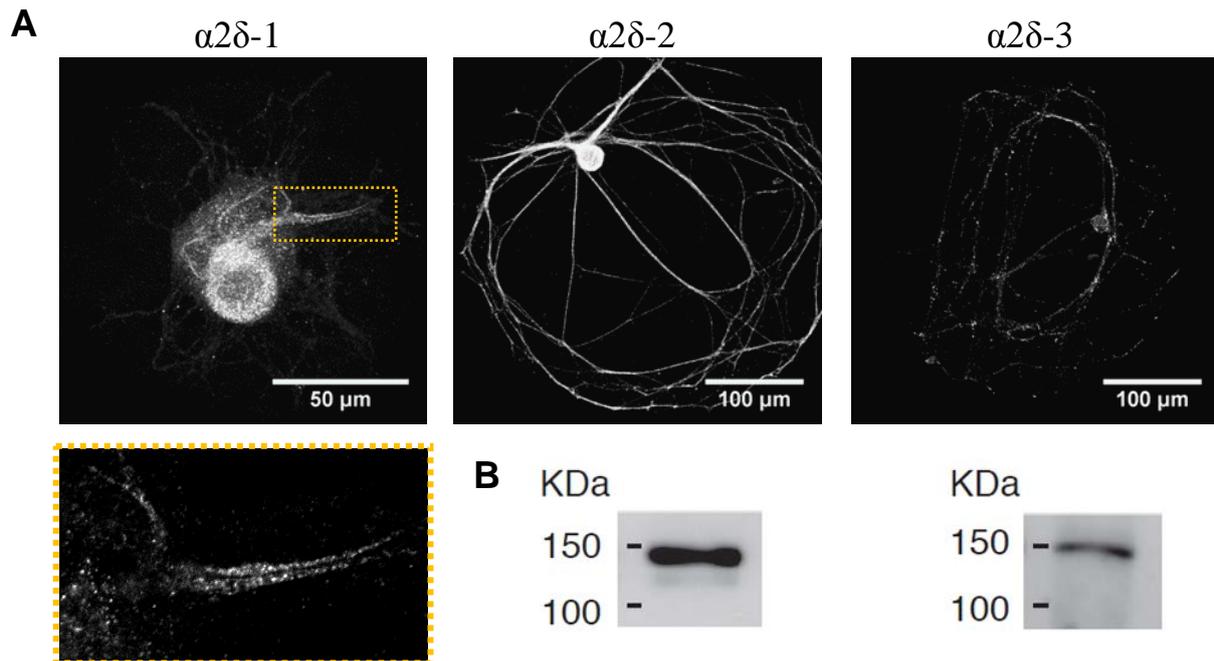


## 1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO AGUDO DE LA PREGABALINA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN.

Para el estudio del primer objetivo de la presente tesis hemos utilizado como preparación experimental microcultivos de neuronas del sistema nervioso periférico (*single cell microcultures*, SCMs). Los microcultivos neuronales ofrecen una plataforma excelente para investigar la transmisión sináptica debido a que proporcionan un escenario reduccionista donde una única neurona establece un circuito monosináptico con propiedades de neurotransmisión estereotipadas (Perez-Gonzalez et al., 2008; Lopez-Murcia et al., 2014). Así, se consigue minimizar la variabilidad impuesta por la conectividad, el desarrollo o la plasticidad dependiente del circuito. Utilizando los SCMs, estas simplificaciones se maximizan debido a que estas neuronas no requieren la contribución de los factores tróficos secretados por las células gliales para crecer. Además forman sinapsis nicotínicas similares a las establecidas a nivel de los ganglios del sistema nervioso autónomo (Perez-Gonzalez et al., 2008). Por todo ello, los SCMs ofrecen un escenario molecular óptimo para estudiar las funciones sinápticas de las subunidades  $\alpha 2\delta$ .

El primer paso fue investigar cuáles de las isoformas de la subunidad  $\alpha 2\delta$  estaban presentes en los microcultivos. Para ello, combinamos ensayos de inmunofluorescencia con *western blot*. Los anticuerpos para  $\alpha 2\delta$ -2 y -3 funcionaron correctamente en *western blot*, obteniendo una banda alrededor de ~140KDa (Figura 40B) de acuerdo con resultados presentes en la literatura (Kadurin et al., 2016; Lana et al., 2016). En el ensayo de inmunofluorescencia el anticuerpo contra la subunidad  $\alpha 2\delta$ -3 no produjo resultados satisfactorios, mientras que el anticuerpo contra la subunidad  $\alpha 2\delta$ -2 dio un marcaje general citoplasmático, difícil de interpretar (Figura 40A). En el caso de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 probamos tres anticuerpos diferentes en *western blot* (Tabla 17), sin obtener resultados satisfactorios. Sin embargo, el anticuerpo contra la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 (1:1000; Lifespan Biosciences) produjo un marcaje específico por inmunofluorescencia, observándose un patrón de expresión punteado en los procesos asodendríticos (Figura 40A). La especificidad de la marca obtenida se comprobó modificando genéticamente los microcultivos con lentivirus que sobreexpresaron de forma específica la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y realizando un análisis cuantitativo posterior sobre el incremento de la fluorescencia respecto a los niveles basales obtenidos en los microcultivos no infectados (Figura 65-67). En

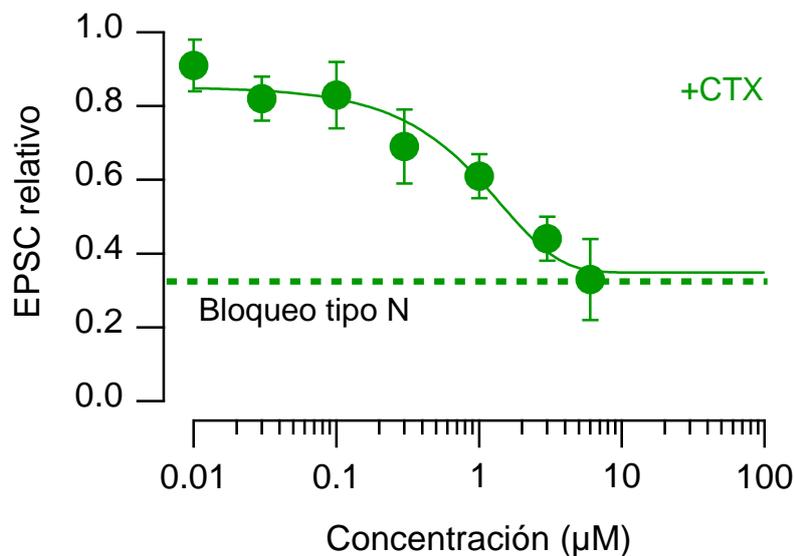
resumen, comprobamos que los microcultivos expresaban las tres principales isoformas de la subunidad  $\alpha 2\delta$ :  $\alpha 2\delta$ -1 y -2, conocidas por ser el receptor donde se unen los fármacos de la familia de los gabapentinoides pregabalina y gabapentina (Field et al., 2006); y  $\alpha 2\delta$ -3, subunidad donde se ha descrito recientemente que interacciona el ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  (NRX1 $\alpha$ ) con gran afinidad, regulando la neurotransmisión a través de los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N (Tong et al., 2017).



**Figura 40. Caracterización de las isoformas de la subunidad  $\alpha 2\delta$  presentes en los microcultivos.** **A)** Ensayo de inmunofluorescencia donde se muestra que los microcultivos expresan las isoformas  $\alpha 2\delta$ -1 (1:1000; Lifespan Biosciences),  $\alpha 2\delta$ -2 (1:1000; Genetex) y  $\alpha 2\delta$ -3 (1:1000; Genetex). **B)** La presencia de las isoformas de  $\alpha 2\delta$ -2 y  $\alpha 2\delta$ -3 se confirmó mediante la técnica de *western blot* a partir de un extracto de proteína total obtenido de cultivos masivos de neuronas del SCG.

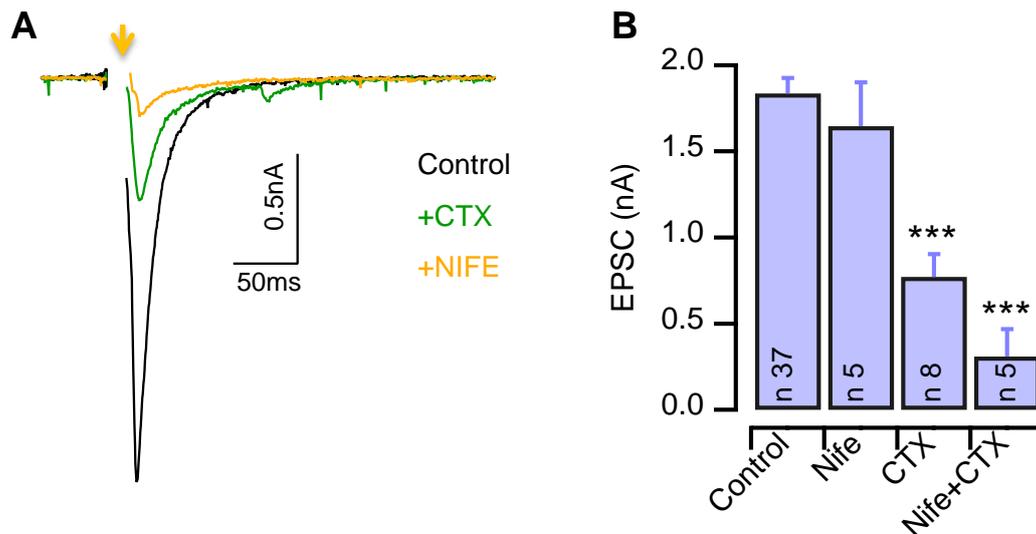
A continuación, nos planteamos averiguar cuáles eran los canales de calcio voltaje-dependientes implicados en la liberación de neurotransmisores en los SCMs. Las subunidades  $\alpha 2\delta$  pueden interactuar con diferentes tipos de canales de calcio voltaje-dependientes (VGCCs) implicados en la liberación de neurotransmisores. Utilizando bloqueantes específicos de los diferentes tipos de canales de calcio, realizamos una disección farmacológica de los VGCCs presentes en los SCMs. Comprobamos que la neurotransmisión estaba controlada por los canales de calcio de tipo N en nuestro sistema (Figura 41, 42 y 49). Al aplicar concentraciones crecientes de la neurotoxina peptídica  $\omega$ -conotoxina-GVIA, un bloqueante selectivo de los canales de calcio de tipo N, observamos una reducción gradual en las

corrientes excitatorias postsinápticas evocadas, hasta alcanzar una reducción superior al 65% de las corrientes evocadas (Figura 42). Estos resultados están en concordancia con datos obtenidos previamente en cultivos masivos de neuronas del ganglio cervical superior (Mochida et al., 2003) y mostraron que en los SCMs la neurotransmisión está controlada por los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N.



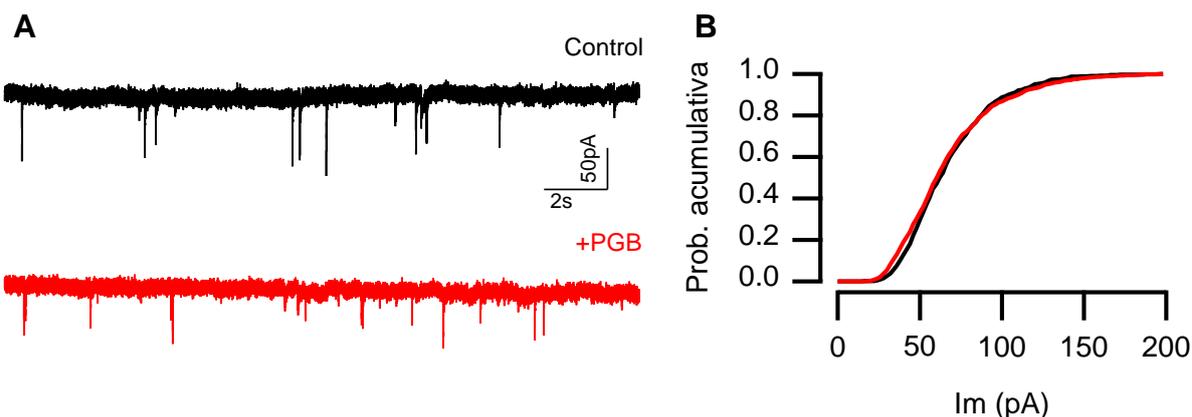
**Figura 41. Dosis-dependencia de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA sobre la neurotransmisión.** Descensos relativos en las amplitudes de los EPSCs tras aplicar concentraciones crecientes de  $\omega$ -conotoxina-GVIA (+CTX), un bloqueante específico de los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N, en un rango que va desde 10nM hasta 6 $\mu$ M. Se alcanza una reducción relativa de los EPSCs de  $0.33 \pm 0.1$  (n=6).

Además, comprobamos que la neurotransmisión restante fue sensible a la nifedipina, un bloqueante de los canales de tipo L. En el ejemplo observamos la corriente autáptica de una neurona, que fue tratada de forma secuencial con 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina-GVIA y posteriormente con 100 $\mu$ M nifedipina. Utilizando este ejemplo evidenciamos que la neurotransmisión desciende más de un 90% en los SCMs cuando bloqueamos la entrada de calcio por los canales de calcio de tipo N y L presinápticos (Figura 42A). Comparando el efecto de la nifedipina aplicada en solitario con el efecto ejercido por la  $\omega$ -conotoxina, comprobamos que la contribución de los canales de tipo L en la neurotransmisión fue minoritaria en los SCMs (Figura 42B). La contribución de otros canales de calcio voltaje-dependientes presentes en neuronas del ganglio superior cervical como los canales de tipo R (Cav2.3) (Scott & Kammermeier, 2017) fue insignificante. Por tanto, comprobamos que en los SCMs la neurotransmisión estaba controlada por los canales de calcio de tipo N.



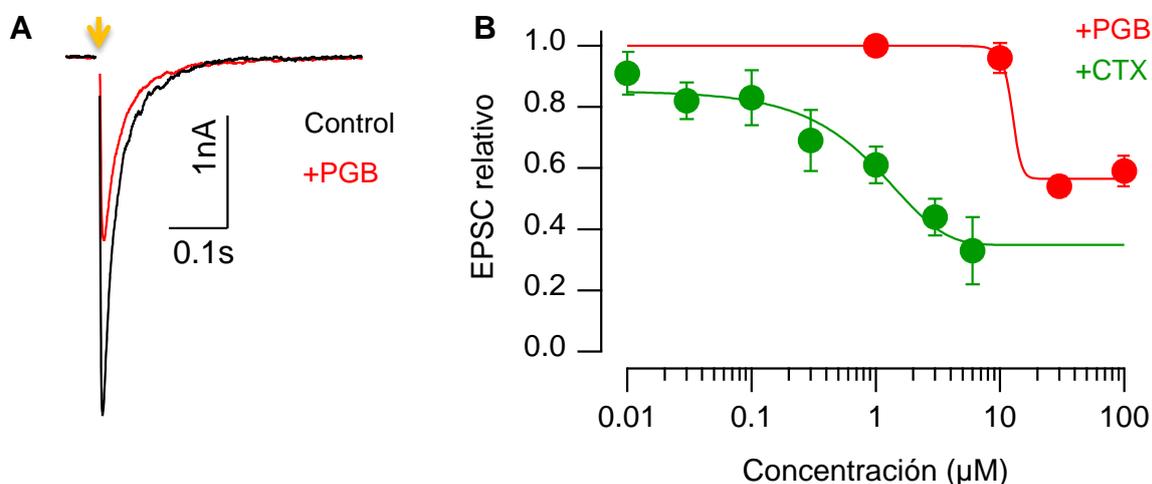
**Figura 42. La neurotransmisión en los SCMs está controlada por los canales de calcio de tipo N.** **A)** Ejemplo de una corriente autáptica control (negro), tratada de forma secuencial con 3 μM ω-conotoxina (verde), bloqueante de los canales tipo N y 100 μM nifedipina (amarillo), bloqueante de los canales tipo L. **B)** Descenso en el tamaño de las corrientes evocadas (EPSCs) en los microcultivos tras la aplicación de bloqueantes selectivos de los canales de tipo L (+100 μM Nifedipina), de tipo N (+3 μM ω-conotoxina-GVIA) y de tipo L+N (+100 μM Nifedipina +3 μM ω-conotoxina-GVIA) ( $p < 0.001$ ).

Posteriormente, decidimos analizar cómo afectaba a la neurotransmisión la interacción de los gabapentinoides con la subunidad  $\alpha 2\delta -1$ . Para el estudio del primer objetivo de la tesis, utilizamos la pregabalina como gabapentinoide prototípico en todos los experimentos de electrofisiología y de fluorescencia simultánea a la electrofisiología, facilitada por Laboratorios Esteve. Además, puntualmente también se utilizó la gabapentina en algunos experimentos como los ensayos de unión a radioligando. En primer lugar, estudiamos cómo afectaba la pregabalina a la neurotransmisión midiendo la actividad espontánea. Utilizando como plataforma los microcultivos, observamos que la pregabalina aplicada de forma aguda en un rango de concentraciones entre 30 y 100 μM no tenía ningún efecto sobre la actividad espontánea (Figura 43). Uno de los distintivos de los SCMs es su baja actividad espontánea, que ocurre típicamente a frecuencias menores a 1 Hz (Albrecht et al., 2012; Perez-Gonzalez et al., 2008). En presencia de la pregabalina, comprobamos que no variaba ni la frecuencia ni la amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSCs).



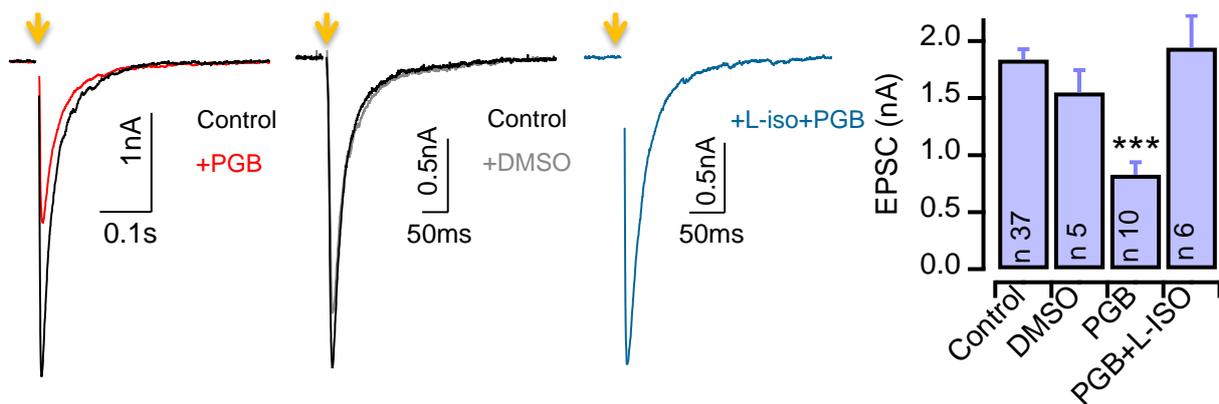
**Figura 43. La pregabalina no afecta a la liberación espontánea en los SCMs.** **A)** Ejemplo de eventos espontáneos en miniatura (mEPSCs) registrados antes y después de aplicar en agudo una concentración de 100  $\mu$ M de pregabalina (rojo). **B)** Probabilidad acumulativa de las amplitudes obtenidas en los mEPSCs en SCMs controles (n=1402) y SCMs tratados con pregabalina (n=1122)

Por el contrario, la aplicación del mismo rango de concentraciones de forma aguda redujo las corrientes autápticas en torno a un  $\sim$ 50% respecto del valor de los EPSCs controles (Figura 44). Este efecto fue concentración dependiente pero difirió de la acción que ejercía la  $\omega$ -conotoxina-GVIA, bloqueando directamente el poro del canal de calcio (la subunidad  $\alpha$ 1). Observamos que mientras que la  $\omega$ -conotoxina-GVIA bloqueaba de forma gradual la amplitud de los EPSCs al añadir concentraciones crecientes de la neurotoxina (Fig. 44), en el caso de la pregabalina se produjo un descenso en la amplitud de los EPSCs a concentraciones mayores de 30 $\mu$ M ( $0.54 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ ;  $n = 22$ ), mientras que a concentraciones inferiores permaneció ineficaz (Figura 44B). Este hecho mostró que la unión de  $\omega$ -conotoxina-GVIA a la subunidad  $\alpha$ 1 y de pregabalina a la subunidad  $\alpha$ 2 $\delta$ -1, afectaban de manera diferente al acoplamiento entre los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N con la neurotransmisión.



**Figura 44. La pregabalina regula de forma aguda la neurotransmisión en los SCMs. A)** Ejemplo de una corriente autáptica control (negro), tratada de forma secuencial con 30 $\mu$ M pregabalina (rojo). **B)** Descensos relativos en la amplitud de las respuestas autápticas en presencia de diferentes concentraciones de pregabalina (rojo) y  $\omega$ -conotoxina (verde) aplicadas de forma aguda.

La acción de la pregabalina se observó pasados más de 5min, ya que requiere la unión a las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1. Además, observamos que la aplicación simultánea de la L-isoileucina, aminoácido que actúa como ligando endógeno de la subunidad  $\alpha 2\delta$ , junto con la pregabalina (ratio 1:10) nos reportó valores en los EPSCs similares a los controles (Figura 45).

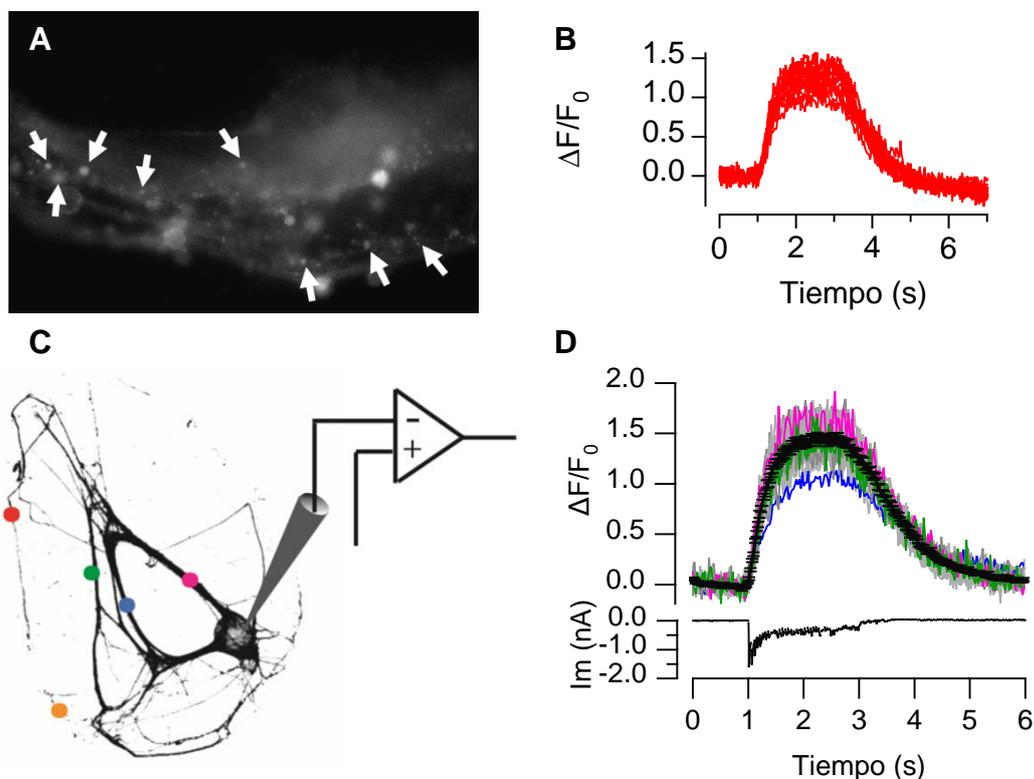


**Figura 45. La L-isoileucina previene la regulación aguda ejercida por la pregabalina sobre la neurotransmisión. A)** Se muestran ejemplos de varias corrientes autápticas: en el primero de ellos la corriente autáptica control (negro) disminuye ~50% al añadir 30 $\mu$ M de pregabalina en agudo (rojo). En otra neurona diferente observamos que un 0.3% de DMSO (gris), que actúa como vehículo, no reduce significativamente la amplitud de los EPSCs. En tercer lugar, observamos otro SCM en el cual tras la aplicación simultánea de 300 $\mu$ M L-Isoileucina y 30 $\mu$ M pregabalina, no se reduce el tamaño de los EPSCs (n=6) **B)** Descenso en el tamaño de las corrientes evocadas (EPSCs) en los microcultivos tras la aplicación de los compuestos indicados: PGB: 30 $\mu$ M pregabalina; PGB+L-ISO: 30 $\mu$ M pregabalina + 300 $\mu$ M L-Isoileucina (\*\*p<0.001).

## 2. REGULACIÓN POR $\alpha 2\delta$ -1 DE LOS COMPONENTES PRE- Y POSTSINÁPTICO DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN SINAPSI AUTÁPTICAS.

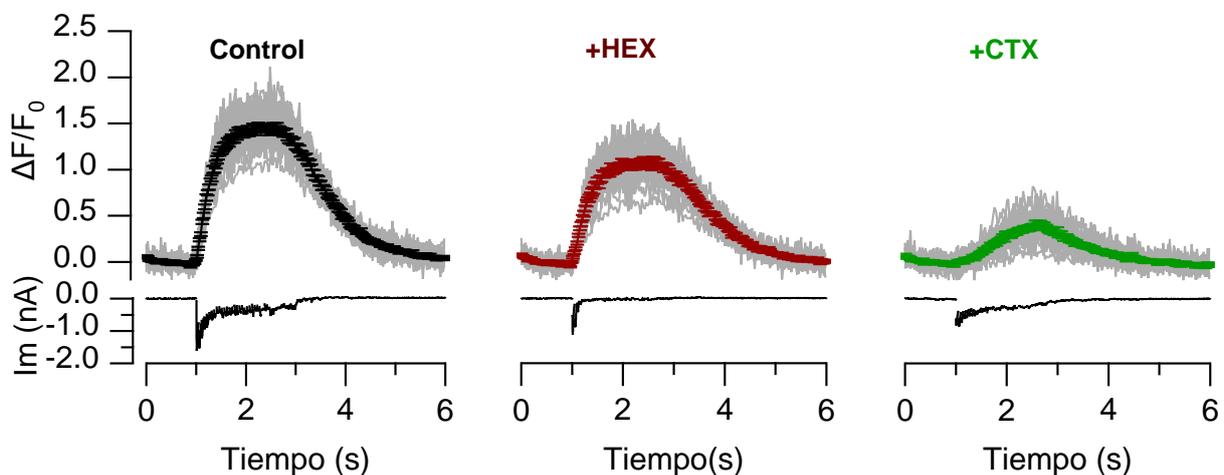
Para diseccionar la contribución de los componentes pre- y postsinápticos en la neurotransmisión, modificamos genéticamente los microcultivos con lentivirus que expresan el indicador de calcio presináptico SyGCaMP6f y realizamos registros de fluorescencia simultáneos a la electrofisiología. Utilizando el mencionado indicador esperábamos obtener una lectura directa de los cambios en la entrada de calcio presináptico (Zhao et al., 2011), de forma simultánea al registro electrofisiológico. Para ello, en primer lugar comprobamos que el constructo respondiera a la estimulación. En el ejemplo observamos una neurona infectada con lentivirus que expresaba el indicador tras 5 días de infección. En él, se observa un patrón de

fluorescencia distribuido por toda la neurona, evidenciándose puntos discretos definidos alrededor del soma y en los procesos axodendríticos, que asumimos como terminales presinápticos potenciales (Figura 46A). Comprobamos que la aplicación de un tren de 30 estímulos a alta frecuencia (20Hz) produjo un incremento de la fluorescencia en los terminales sinápticos putativos, que correlacionaba con la respuesta postsináptica evocada (Figura 46D). El aumento en la entrada de calcio presináptico durante la estimulación sostenida fue medido analizando los cambios relativos en la fluorescencia basal ( $\Delta F/F_0$ ) del indicador SyGCaMP6f (Figura 37 y 46B).



**Figura 46. El indicador SyGCaMP6f nos permite monitorizar cambios en la entrada de calcio presináptico.** Utilizando el indicador de calcio presináptico SyGCaMP6f podemos visualizar la entrada de calcio presináptico y monitorizar su comportamiento durante la estimulación neuronal. **A)** Las sinapsis potenciales aparecen seleccionadas (flechas) centradas en los puntos de fluorescencia. **B)** El aumento en la entrada de calcio presináptico durante una estimulación sostenida lo medimos comparando los cambios relativos en la fluorescencia basal del indicador SyGCaMP6f, medidos como  $(F-F_0)/F_0$  en las posibles sinapsis. En este caso, SyGCaMP6f reporta un incremento relativo respecto a la fluorescencia basal  $>150\%$ . **C)** Los SCMs se estimulan mediante una pipeta de *patch* localizada en el soma de la neurona usando trenes de estímulos de alta frecuencia (20Hz) en la configuración de *whole-cell*. Se muestra una representación esquemática de potenciales sinapsis marcadas con diferentes colores. **D)** Incremento en la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f durante la estimulación neuronal del SCM.

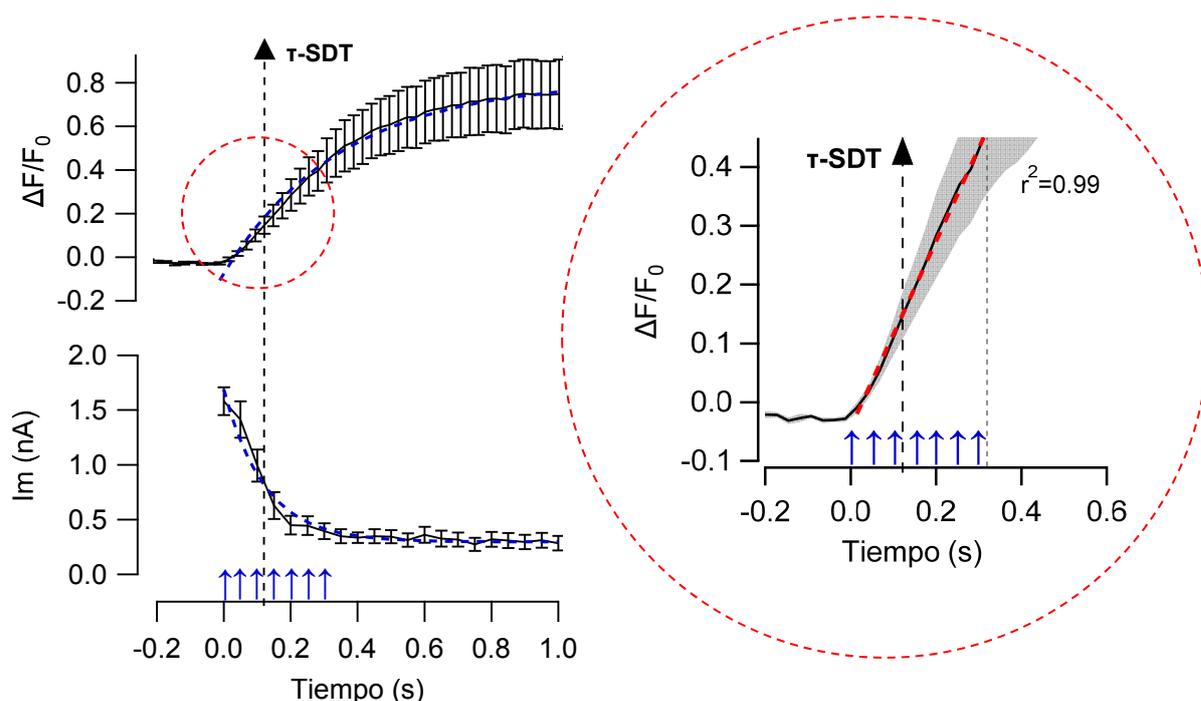
Una vez establecidos los registros de fluorescencia simultáneos a la estimulación neuronal, procedimos a aislar farmacológicamente la contribución de los terminales pre- y postsinápticos a las respuestas sinápticas evocadas. Para ello, aplicamos trenes de 30 estímulos a 20Hz y analizamos los incrementos de fluorescencia en los posibles terminales sinápticos. De nuevo, observamos que se produjo un incremento en la fluorescencia basal del indicador SyGCaMP6f durante la estimulación neuronal >100% (Figura 47A). En presencia de 100 $\mu$ M hexametonio en la solución externa de registro, un bloqueante de los receptores nicotínicos postsinápticos, no se modificó la cinética en la entrada de calcio presináptico, pero sí descendieron las respuestas postsinápticas. A continuación, lavamos el hexametonio y aplicamos 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina-GVIA. Así observamos que se enlenteció la cinética de entrada de calcio y además se redujo la corriente postsináptica asociada al estar bloqueada la entrada de calcio por los canales presinápticos de tipo N. En consecuencia, podemos concluir que el uso de esta herramienta permite discriminar la contribución de los terminales pre- y postsinápticos a la transmisión sináptica. Mediante el registro simultáneo fue posible aislar la contribución de los terminales pre- y postsinápticos visualizando cambios en la entrada de calcio presináptico durante la estimulación neuronal (Figura 47).



**Figura 47. Disociación de la actividad pre- y postsináptica en los SCMs.** Ejemplo que muestra un SCM en el que se registra de forma simultánea la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f y las respuestas postsinápticas evocadas. Observamos los cambios relativos en la fluorescencia ( $\Delta F/F_0$ ) de múltiples potenciales terminales presinápticos (marcados en gris) y el promedio de todos los trazos analizados (negro). La aplicación secuencial de hexametonio (+HEX), bloqueante de los receptores nicotínicos postsinápticos, y de  $\omega$ -conotoxina-GVIA (+CTX), bloqueante de los canales de calcio presinápticos de tipo N, se muestran para discriminar la contribución de los terminales post- y presinápticos, respectivamente. La constante de tiempo para el incremento de calcio presináptico ( $t_{Ca^{2+}}$ ) del control es de 385ms; +HEX=450ms y +CTX=2500ms.

## 2.1 Identificación del mecanismo de la depresión a corto plazo disociando la actividad pre- y postsináptica.

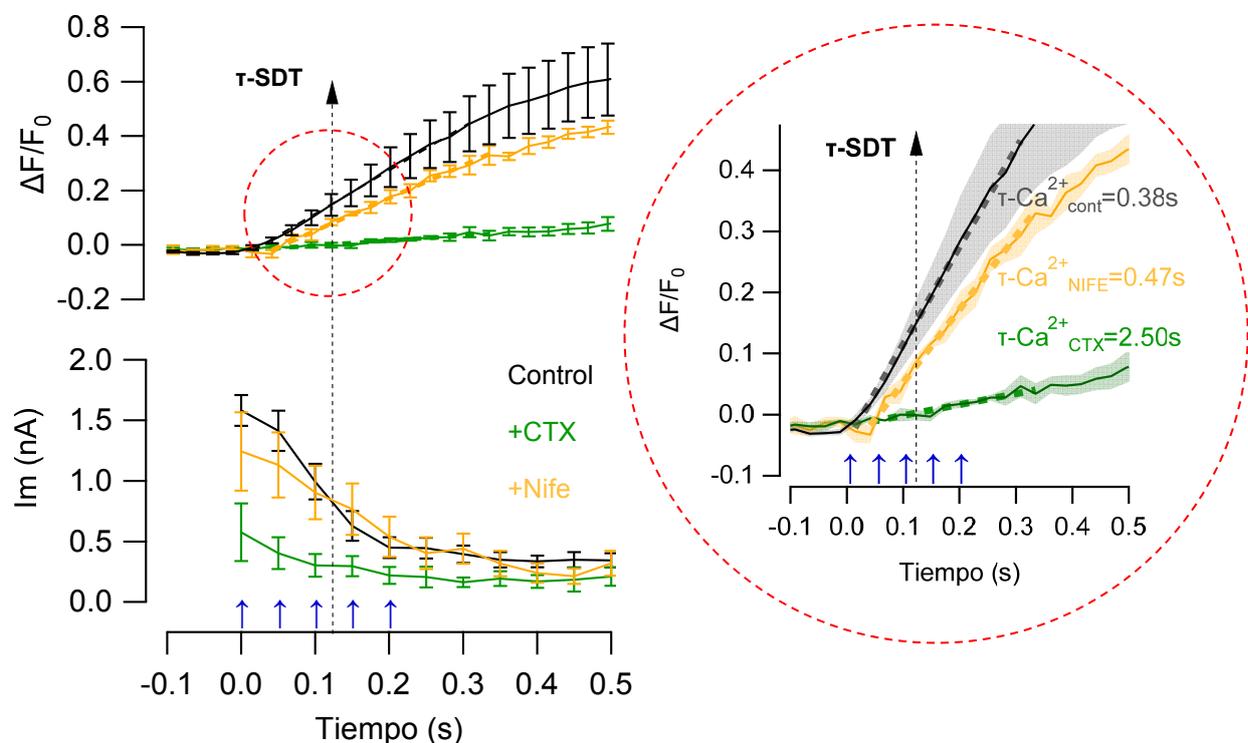
La depresión a corto plazo (STD, acrónimo del inglés *short term depression*) puede aprovecharse para inferir la organización de los depósitos de vesículas sinápticas (Schneppenburger et al., 2002; Thanawala & Regehr, 2016). Sin embargo, existen factores sinápticos específicos tales como la inactivación de los canales de calcio voltaje-dependientes que pueden producir imprecisiones al realizar estimaciones cuantitativas (Thanawala & Regehr, 2016). En los SCMs la separación de las respuestas pre- y postsinápticas permitió conocer el origen de la depresión a corto plazo causada por un tren de estímulos a alta frecuencia. Valoramos dos posibilidades: 1) que se produjese como consecuencia del vaciado de las vesículas sinápticas del depósito de liberación rápida o 2) que se debiera a la inactivación de los canales de calcio. En los SCMs registrados como controles comprobamos que la depresión a corto plazo de la respuesta postsináptica sucedió durante la fase lineal de la entrada de calcio en el terminal presináptico, antes de que se produjese la inactivación de los canales de calcio voltaje-dependientes (Figura 48). La constante de tiempo para la depresión a corto plazo ( $t$ -STD) en las neuronas registradas sin tratar usadas como controles fue de 123ms, lo cual indicó que a partir del cuarto estímulo aplicado durante los trenes de estímulos de alta frecuencia (20Hz) la caída en la neurotransmisión fue superior a un 63%, evidenciándose que las vesículas sinápticas del RRP esencialmente se liberaron durante los cuatro primeros pulsos donados. Sin embargo, la entrada de calcio en el terminal presináptico se ajustó a una función lineal durante al menos los siete primeros pulsos donados a 20Hz ( $r^2=0.99$ ), lo cual demostró que los canales no se encontraban inactivados durante el periodo en el que se produjo la depresión a corto plazo (Figura 48). Por tanto, se descartó que la depresión a corto plazo sucediera debido a la inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje durante la estimulación de las neuronas con trenes a alta frecuencia (20Hz). Por el contrario, el análisis de las respuestas acopladas evidenció que la depresión a corto plazo en los SCMs estaba mediada exclusivamente por el vaciado de las vesículas sinápticas del RRP.



**Figura 48. La depresión a corto plazo en los SCMs no es dependiente de la inactivación de los canales de calcio voltaje dependientes presinápticos.** Promedio de los registros asociados de entrada de calcio presináptico y respuestas postsinápticas en las neuronas usadas como controles ( $n=17$ ). Las líneas punteadas azules se ajustan exponencialmente a los datos obtenidos. t-STD: constante de tiempo para la depresión a corto plazo. La caída del 63% en el tamaño del EPSC (t-STD) se indica con la flecha con línea discontinua (123ms). Se observa que la depresión a corto plazo sucede durante la fase lineal de la entrada de calcio en el terminal presináptico: a partir del cuarto estímulo del tren (150ms) la caída en la neurotransmisión es mayor al 63%, mientras que la entrada de calcio presináptico se ajusta a una función lineal hasta al menos el séptimo pulso aplicado ( $\sim 300$ ms), indicando que no se produce inactivación de los canales de calcio voltaje-dependientes durante la liberación de las vesículas del RRP. Las líneas sólidas indican los valores promedios  $\pm$  error estándar.

Asimismo, la separación de las respuestas pre- y postsinápticas en los SCMs nos permitió comparar el efecto de la aplicación de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA y la nifedipina en la cinética de entrada de calcio en el terminal presináptico y relacionarlo con la liberación de neurotransmisores. Utilizando los promedios de todos los registros acoplados en los que bloqueamos la entrada de calcio por los canales de tipo N y L con la  $\omega$ -conotoxina-GVIA y la nifedipina, respectivamente, verificamos que la liberación del RRP estaba controlada esencialmente por la entrada de calcio a través de los canales tipo N (Figura 49). Cuando bloqueamos los canales de calcio voltaje-dependientes tipo N con la  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $3\mu\text{M}$ ), la cinética de entrada de calcio se enlenteció de manera drástica ( $t\text{-Ca}^{2+}=2.5\text{s}$ ), disminuyendo la liberación de las vesículas sinápticas del RRP durante los primeros estímulos tras la estimulación con los trenes de alta frecuencia (20Hz), al estar bloqueada la entrada de calcio a través de los canales de tipo N. Sin embargo, al

bloquear la entrada de calcio a través de los canales de tipo L con la nifedipina (100 $\mu$ M), prácticamente no se modificó la cinética de entrada de calcio presináptico ( $t\text{-Ca}^{2+}=0.47\text{s}$ ) con respecto a las neuronas no tratadas, usadas como controles, y durante la estimulación con los trenes a alta frecuencia, se produjo la liberación de las vesículas del RRP durante los cuatro primeros pulsos ( $t\text{-STD}=181\text{ms}$ ), de forma similar a la observada en las neuronas usadas como controles (Figura 48). De manera conjunta, las evidencias descritas demostraron que la aplicación de trenes de estímulos a alta frecuencia en los SCMs produjo depresión a corto plazo sin implicar inactivación de los canales de tipo N.



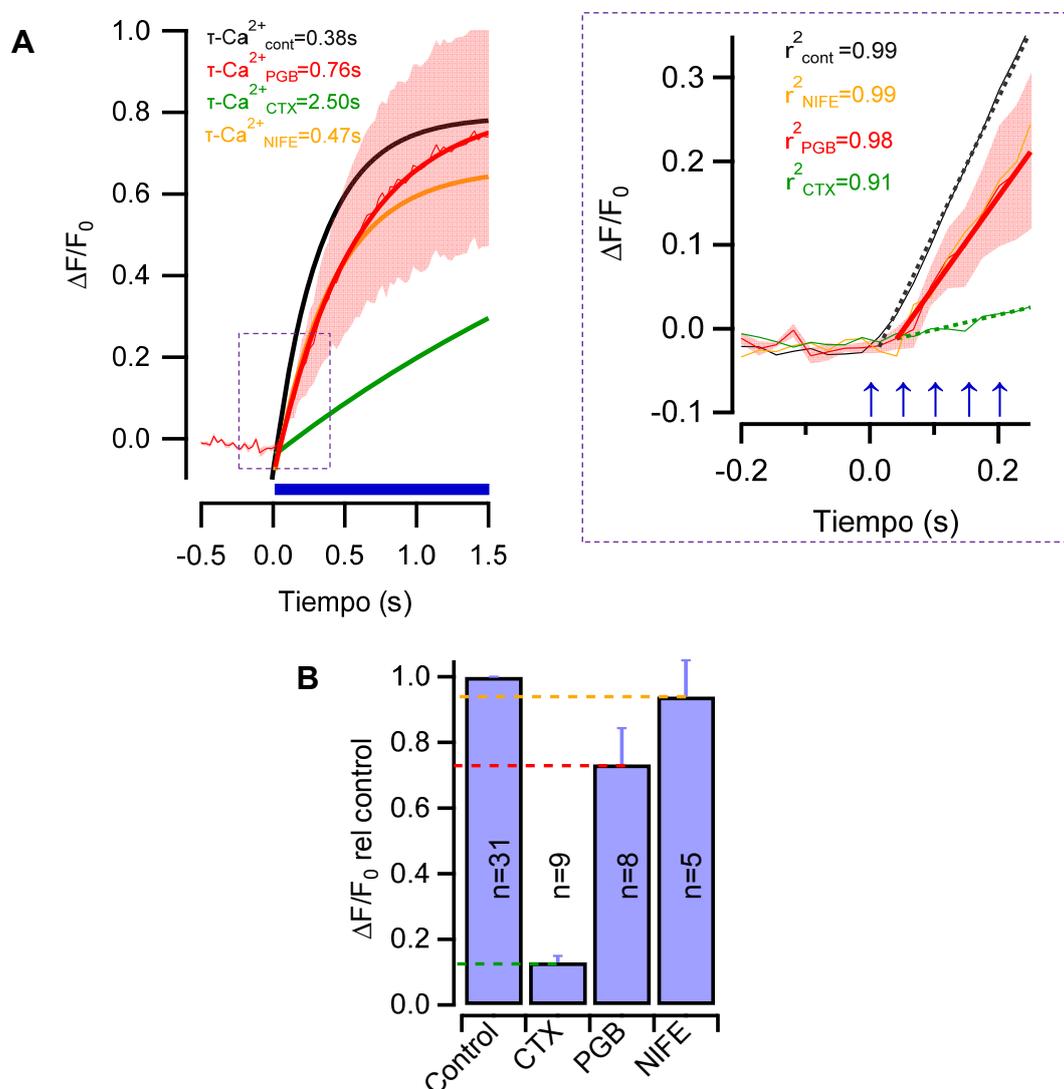
**Figura 49. La liberación de neurotransmisores en los SCMs está controlada por la entrada de calcio a través de los canales tipo N.** Valores promedio de los registros acoplados de entrada de calcio presináptico asociado a las respuestas postsinápticas obtenidas en presencia de 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina-GVIA (n=9, verde) y 100 $\mu$ M nifedipina (n=5, amarillo). Se observa que tras la aplicación de de un tren de estímulos a 20Hz, tras los 3-4 primeros pulsos se produce un descenso en la neurotransmisión >63% en el caso de las neuronas sin tratar, o de las neuronas tratadas en agudo con la nifedipina. En el caso de las neuronas tratadas con la  $\omega$ -conotoxina-GVIA, se bloquea la liberación de las vesículas del RRP durante los primeros pulsos y la constante de tiempo para la entrada de calcio en el terminal presináptico ( $t\text{-Ca}^{2+}$ ) se entelrece hasta 2500ms. Las líneas sólidas indican los valores promedios  $\pm$ error estándar.

## 2.2 Efecto de los gabapentinoides sobre los terminales pre- y postsináptico.

Durante el desarrollo de la tesis hemos observado que la pregabalina regula de forma aguda la neurotransmisión en los SCMs, reduciendo hasta en un ~50% las corrientes autópticas (Figuras 44-45). El efecto agudo de los gabapentinoides en la neurotransmisión puede deberse a un descenso de la entrada de calcio (Hernández-Vivanco et al., 2012) o una alteración en la liberación de las vesículas sinápticas (Micheva et al., 2006). Otros factores que pueden participar son la interacción competitiva con ligandos endógenos como la L-leucina, L-isoleucina y L-metionina (Thurlow et al., 1993; Figura 45) o la combinación de fracciones móviles e inmóviles de los VGCCs en el terminal presináptico (Schneider et al., 2015). El registro simultáneo de la entrada de calcio presináptico durante la estimulación fue una herramienta útil para encontrar el mecanismo de acción de la pregabalina. Utilizando el indicador SyGaMP6f realizamos registros de fluorescencia simultánea a la electrofisiología para discriminar el efecto de la pregabalina sobre los componentes pre- y postsináptico de la neurotransmisión.

En primer lugar, estudiamos si la unión de la pregabalina a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 modificaba a la entrada de calcio presináptico. Estudios anteriores mostraron que la pregabalina reducía moderadamente la amplitud de las corrientes de calcio presináptico que inducen la liberación de vesículas sinápticas en los cálices de Held (Di Guilmi et al., 2011) y en células cromafines (Hernández-Vivanco et al., 2012). En consonancia con estos estudios, observamos que la pregabalina redujo la constante de tiempo para el incremento de calcio presináptico durante la estimulación hasta ~760ms, aproximadamente 2 veces más lenta que los controles (Figura 50A). Además, en término de cambios relativos en la entrada de calcio durante la fase lineal de las respuestas ( $\Delta F/F_0$  del indicador SyGCaMP6f durante los primeros 200ms de la estimulación en las neuronas tratadas respecto a la entrada de calcio en neuronas no tratadas), comprobamos que la pregabalina no disminuyó de forma notable la entrada de calcio presináptico, produciendo un descenso aproximado del ~25% en la entrada de calcio en el terminal presináptico durante los primeros cinco estímulos del tren (200ms) aplicado a 20Hz ( $\Delta F/F_{rel}=0.74\pm 0.11$ ; Figura 50B). En términos de cambios relativos de  $\Delta F/F_0$  y de cinética de entrada de calcio, la pregabalina se comportó de manera similar a la nifedipina (Figura 50A), por ello esperábamos que la pregabalina ejerciese un efecto sobre la neurotransmisión

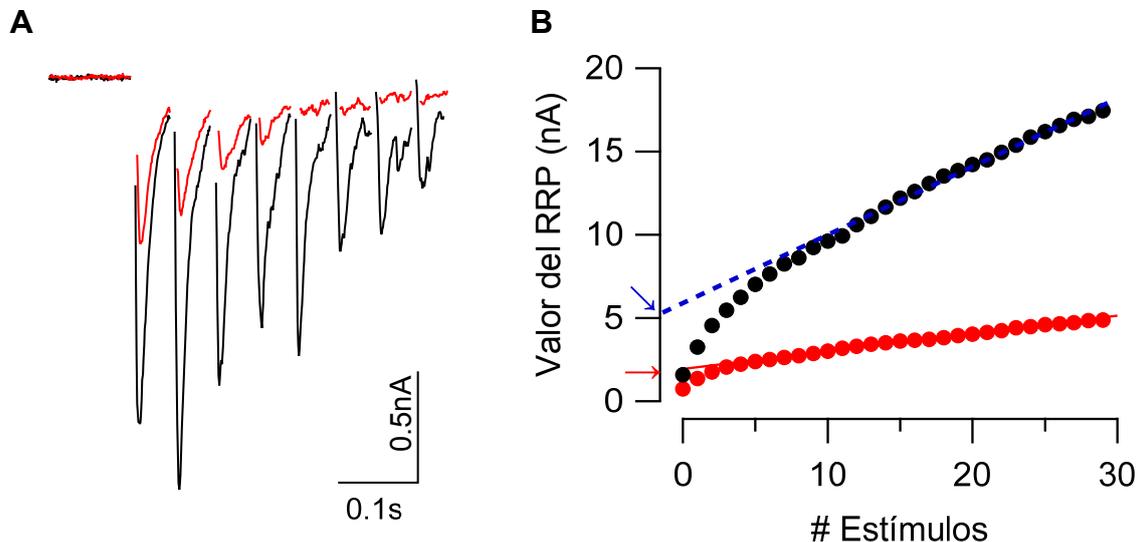
comparable al ejercido después de bloquear la entrada de calcio por el canal de calcio de tipo L, aplicando la nifedipina de forma aguda. Sin embargo, el análisis de las respuestas sinápticas mostró que este no fue el caso.



**Figura 50. La pregabalina no modifica significativamente la entrada de calcio presináptico en los SCMs. A)** Valores promedio de los incrementos en la entrada de calcio presináptico durante la aplicación de un tren de 30 estímulos a 20Hz en presencia de pregabalina. La línea sólida indica el valor promedio y las sombras el error estándar. El incremento de fluorescencia ( $\Delta F/F_0$ ) del indicador SyGCaMP6f se ajusta a una exponencial simple. Se muestran los valores de las constantes de tiempo para el incremento de calcio presináptico en los controles (n=17; negro) y en las neuronas tratadas con 30 $\mu$ M pregabalina (n=8, en rojo), 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina (n=9, en verde) o 100 $\mu$ M nifedipina (n=5, en amarillo). **B)** Cambios relativos en la entrada de calcio presináptico durante la fase lineal de las respuestas (200ms). (+CTX: 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina; +PGB: 30 $\mu$ M pregabalina; +Nife: 100 $\mu$ M nifedipina).

Posteriormente, comprobamos si la unión de la pregabalina a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 afectaba a la liberación de las vesículas sinápticas. Considerando que en los SCMs la depresión a corto plazo se generaba por una depleción simple de las vesículas sinápticas (Figura 48), decidimos utilizar como método para estimar de

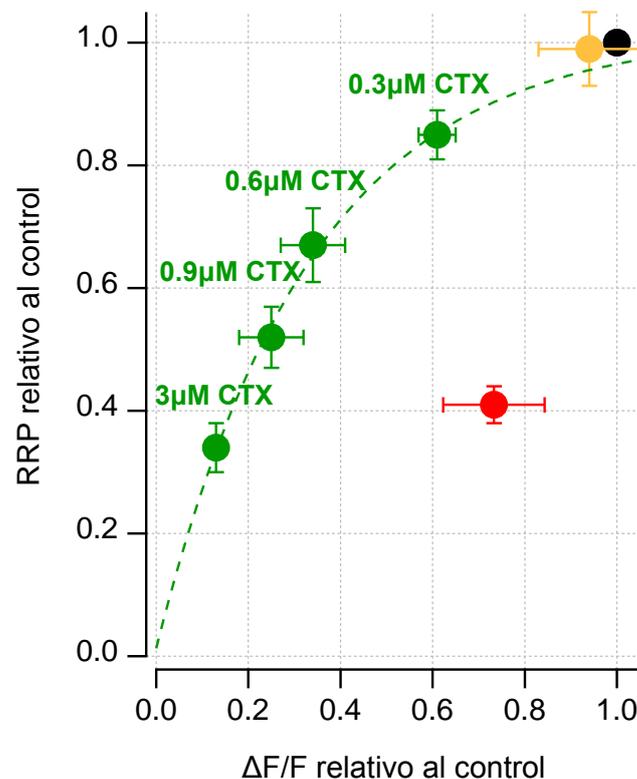
forma precisa el valor del RRP los trenes de estímulos a alta frecuencia. El ejemplo de la Figura 51 muestra que el tamaño del RRP se redujo hasta un 60% después de su exposición a la pregabalina.



**Figura 51. La unión de pregabalina a  $\alpha 2\delta$ -1 modifica el tamaño del depósito de liberación rápida (RRP).** **A**) Ejemplo donde se muestran las primeras respuestas postsinápticas tras la aplicación de un tren de estímulos en ausencia (negro) o presencia de 30µM pregabalina durante >10min (rojo). **B**) El tamaño del RRP se estima a partir de la representación de las amplitudes acumulativas de las respuestas postsinápticas evocadas frente al número de estímulos aplicados. La fase estacionaria de la liberación de vesículas se ajusta a una función lineal y el cruce con el eje de ordenadas corresponde con el valor del tamaño del RRP.

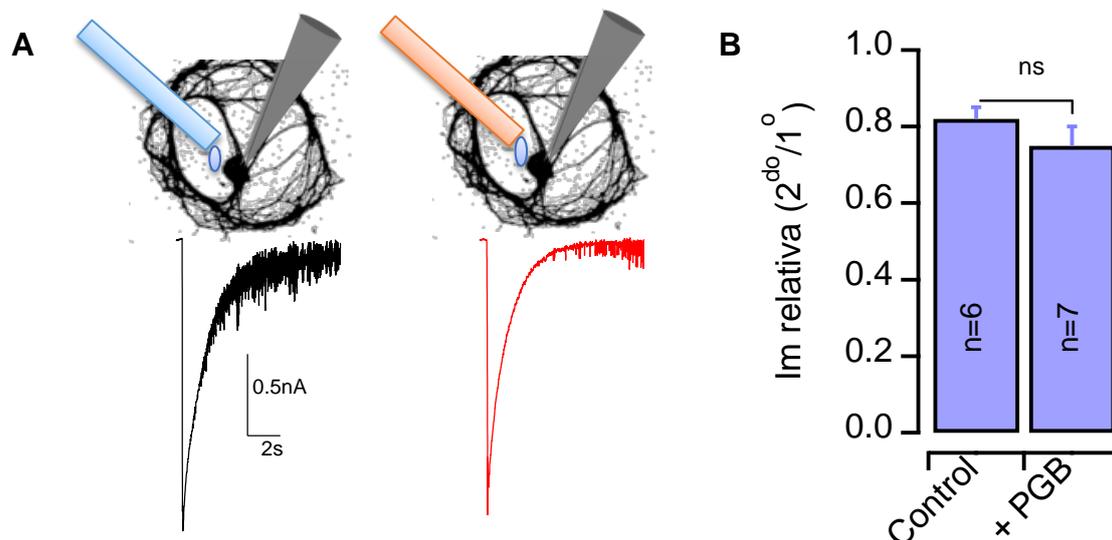
A continuación, comparamos esta acción con el efecto que produjo el bloqueo farmacológico de los canales de calcio voltaje-dependientes sobre el tamaño relativo del RRP (Figura 52). En las neuronas, la relación entre la entrada de calcio en el terminal presináptico y la liberación de neurotransmisores no es lineal, sino que está elevada a la tercera o cuarta potencia, tratándose de un fenómeno altamente cooperativo en el que pequeños cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  pueden producir efectos dramáticos en la probabilidad de liberación (Augustine, 2001; Dodge & Rahamimoff, 1967). Por lo tanto, en el caso particular de la pregabalina, decidimos estudiar si podría atribuirse el descenso en la neurotransmisión a la reducción de la entrada de calcio observada en el terminal presináptico (Figura 50). Para comprobar esta posibilidad, aplicamos concentraciones crecientes de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA induciendo así una reducción gradual en el número de copias funcionales del canal de calcio tipo N activos. De esta forma comprobamos que existía una relación exponencial entre los cambios relativos en la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f ( $\Delta F/F_0$ ) y la reducción del tamaño relativo del RRP (Figura 52). El

efecto de la pregabalina aplicada de forma aguda, sin embargo, se alejó de la relación descrita cuando se produjo el bloqueo de los canales de tipo N: en términos de entrada de calcio presináptico, la acción de la pregabalina ( $\Delta F/F_{rel}=0.74\pm 0.11$ ) recordaba a la acción ejercida por la  $\omega$ -conotoxina-GVIA a una concentración de  $0.3\mu\text{M}$  ( $\Delta F/F_{rel}=0.61\pm 0.05$ ). Por ello, esperábamos que su efecto sobre la reducción del RRP fuera similar al descenso obtenido bloqueando los canales de tipo N en presencia de la  $\omega$ -conotoxina a una concentración de  $0.3\mu\text{M}$  ( $RRP_{rel}=0.85\pm 0.04$ ). Sin embargo, la pregabalina produjo una reducción aproximada en el tamaño relativo del RRP del  $\sim 60\%$  ( $RRP_{rel}=0.41\pm 0.03$ ), similar a niveles que corresponderían al bloqueo prácticamente total de los canales de calcio de tipo N ( $\sim 2\mu\text{M}$   $\omega$ -conotoxina-GVIA). Por lo tanto, el efecto de la pregabalina sobre la neurotransmisión no pudo atribuirse a una menor entrada de calcio en el terminal presináptico.



**Figura 52. La pregabalina altera el acoplamiento funcional entre los canales de calcio de tipo N y el depósito de vesículas de liberación rápida (RRP).** Representación del descenso en el tamaño relativo del RRP en función de los cambios relativos en la entrada de calcio presináptico ( $\Delta F/F_0$ ) durante los primeros 200ms tras la aplicación de un tren de 30 estímulos a 20Hz. Los SCMs fueron expuestos a las concentraciones indicadas de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (+CTX),  $100\mu\text{M}$  nifedipina (amarillo) o  $30\mu\text{M}$  PGB (rojo). Se observa el efecto diferencial de la pregabalina respecto al descenso relativo en el tamaño del RRP generado tras la aplicación de concentraciones crecientes del bloqueante del canal de calcio de tipo N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA, en un intervalo de  $300\text{nM}$  a  $3\mu\text{M}$ . La aplicación de  $100\mu\text{M}$  nifedipina, bloqueante de los canales de tipo L, no varía la entrada de calcio presináptico ni produce un descenso en la liberación de las vesículas del RRP.

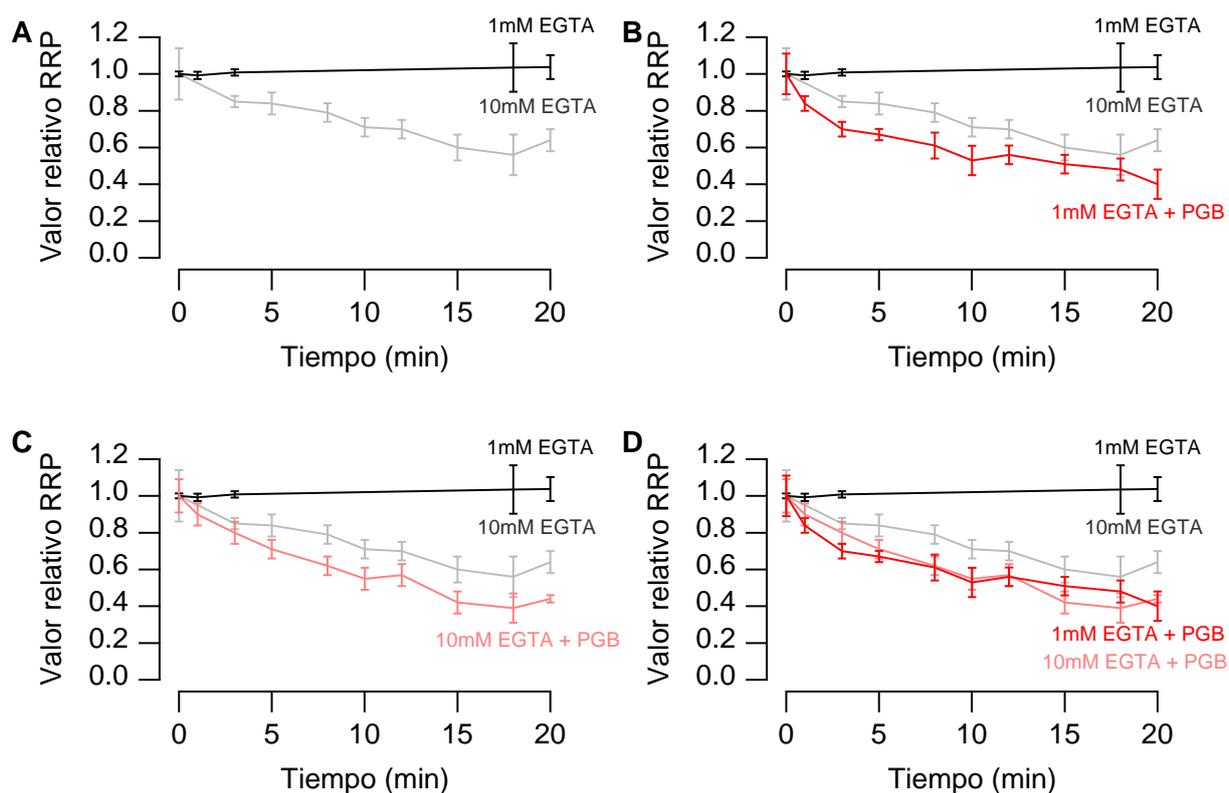
Una posibilidad que podría explicar la reducción de la neurotransmisión en presencia de pregabalina en los SCMs sería que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 interaccionase con los receptores nicotínicos postsinápticos. De hecho, una publicación reciente sugiere que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 interacciona con los receptores NMDA (Chen et al., 2018). Si  $\alpha 2\delta$ -1 interaccionase con los receptores nicotínicos postsinápticos, en presencia de la pregabalina observaríamos un descenso de la respuesta evocada después de aplicar un pulso químico a las neuronas con una gota de acetilcolina (ACh), al activar de forma exclusiva los receptores postsinápticos. La presencia de ACh permite la activación única de los receptores postsinápticos sin la participación del terminal presináptico, y por tanto supone un buen método para descartar cambios a nivel postsináptico. De esta forma, estimamos la posible contribución postsináptica sobre los efectos observados en la reducción de los EPSCs, aplicando de forma local un *puff* de 100 $\mu$ M acetilcolina. Aplicando una pequeña gota ( $\sim$ 50 $\mu$ L) de acetilcolina sobre el soma de las neuronas, activamos los receptores nicotínicos y obtuvimos respuestas exclusivamente postsinápticas de las corrientes nicotínicas (Figura 53A). En el caso de la pregabalina, comprobamos que su efecto era verdaderamente presináptico, al no modificarse las respuestas postsinápticas puras en presencia del fármaco. De esta forma, descartamos que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 interaccionase con el receptor nicotínico en los SCMs.



**Figura 53. La acción de la pregabalina sobre la neurotransmisión es exclusivamente presináptica.** **A)** Estimulación de un SCM aplicando de forma local una microgota de acetilcolina (100 $\mu$ M). La primera respuesta (control, en negro) es comparable a la segunda corriente nicotínica obtenida en presencia de 30 $\mu$ M pregabalina (rojo). **B)** Resumen de las respuestas relativas de los estímulos pareados obtenidos en condiciones control (negro) o cuando el segundo *puff* es aplicado en presencia de 30 $\mu$ M pregabalina. Se muestran los valores promedios  $\pm$  error estándar.

### 2.3 Identificación de las vesículas sinápticas sujetas al efecto regulatorio de la pregabalina.

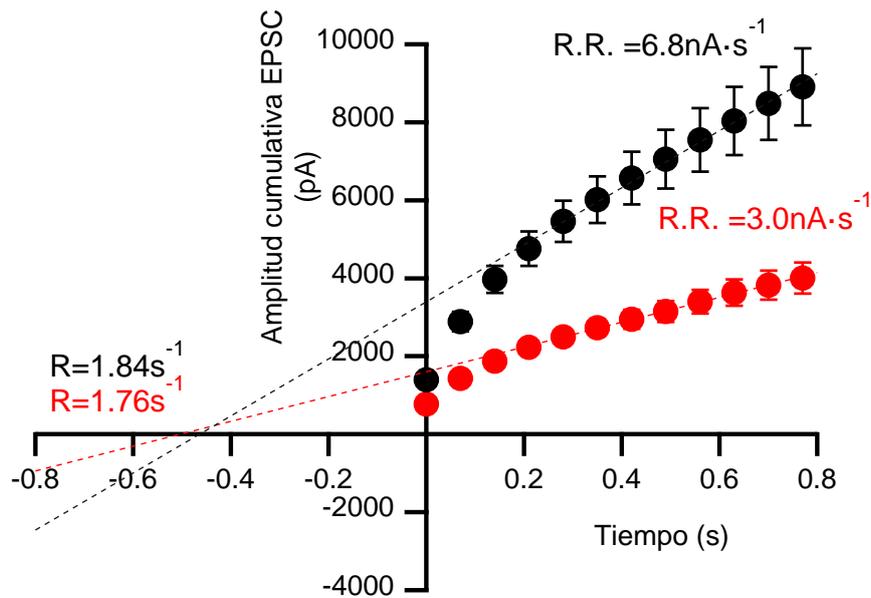
Los tampones móviles intracelulares de calcio regulan la eficiencia del flujo de calcio presináptico desencadenando la liberación rápida de neurotransmisores (Burrone et al., 2002). En los SCMs los tampones de calcio endógenos se pueden substituir por agentes quelantes de calcio exógenos a través de la diálisis del contenido de la solución interna de la pipeta de registro durante  $\geq 15$ min en la configuración de *whole-cell* (Lopez-Murcia et al., 2014). Así, comprobamos que el tamaño del RRP permaneció constante cuando la pipeta de registro contenía 1mM EGTA, lo cual nos sugirió la presencia de una concentración equivalente en el citoplasma de los tampones de calcio endógenos. Por el contrario, un incremento de 10 veces en la concentración de EGTA produjo un descenso en el tamaño aparente del RRP (Figura 54A) como resultado de una expansión limitada de los microdominios de calcio (Beaumont et al., 2005)



**Figura 54. El efecto de la pregabalina sobre el RRP no se altera al incrementar la concentración intracelular de EGTA.** Los SCMs se dializan con soluciones internas que contienen 1mM o 10mM EGTA (A). El tamaño del RRP se reduce ~40% tras la dialización durante ~20min del agente quelante (10mM EGTA). El efecto de la pregabalina sobre el RRP no se modifica variando la concentración intracelular de EGTA de 1mM (B) a 10mM (C). La acción que ejerce la pregabalina reduciendo el tamaño del RRP es similar a la acción que ejerce el agente quelante EGTA cuando se incrementa su concentración 10 veces (D).

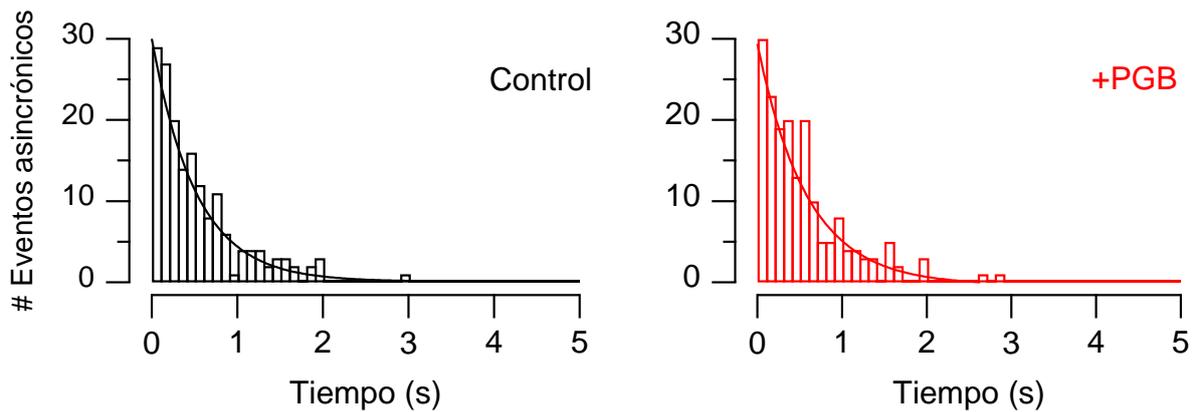
En el caso de la pregabalina, su acción fue independiente de la concentración intracelular del tampón de calcio usada, al no verse incrementada en presencia de 10mM EGTA en el citoplasma (Figura 54B C y D). Observamos una reducción similar en el tamaño del RRP, bien incrementando la concentración del tampón de calcio intracelular (10mM EGTA) o al añadir pregabalina, sugiriendo que ambas maniobras afectaban al mismo conjunto de vesículas sinápticas, aunque a través de diferentes mecanismos (Figura 54C). El incremento en la concentración de EGTA es particularmente efectivo desacoplando la liberación de las vesículas sinápticas localizadas lejos de los canales de calcio (Neher, 1998). Por ello, aquellas vesículas que no se vieron afectadas por la pregabalina o por un aumento de 10 veces en la concentración de EGTA fueron probablemente aquellas que estaban localizadas más próximas a los canales de calcio voltaje-dependientes.

Durante un tren de estimulación a alta frecuencia y después de producirse el vaciado del depósito de liberación rápida (RRP), se produce la liberación continua de las vesículas sinápticas del depósito de reciclaje (RP, *reserve pool*) (Denker & Rizzoli, 2010). El siguiente paso fue comprobar si la unión de pregabalina a  $\alpha 2\delta$ -1 regulaba la liberación del RP. En los SCMs comprobamos que la aplicación de la pregabalina de forma aguda reducía tanto la liberación de las vesículas sinápticas del RRP (Figura 51), como las del RP. En concreto, la secreción de las vesículas del RP se redujo hasta la mitad, al descender la tasa de liberación lineal de depósito de reciclaje de  $6.8\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $3.0\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$  en presencia de la pregabalina (Figura 55). Sin embargo, la velocidad de rellenado de las vesículas del RRP de la zona activa con las vesículas del depósito de reciclaje ( $\sim 1.8\text{s}^{-1}$ ) no se vio alterada en presencia de la pregabalina ( $n=10$  células). El valor se obtuvo asumiendo que la velocidad de rellenado de las vesículas del RRP con las vesículas del RP siguió una función lineal, dividiendo la tasa de liberación del depósito de reciclaje entre el valor del tamaño del RRP (Figura 55A). Este resultado evidenció que la tasa de liberación del depósito de reciclaje se adaptaba al disminuir el tamaño del RRP en presencia de la pregabalina. Sin embargo, el suministro de las vesículas sinápticas del RRP con las vesículas del RP durante una estimulación prolongada se mantuvo, al no variar la velocidad de rellenado de las vesículas del RRP de la zona activa con las vesículas del RP en presencia de la pregabalina ( $\sim 1.8\text{s}^{-1}$ ).



**Figura 55. La unión de la pregabalina a las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 modifica la liberación de los depósitos de vesículas del RP y del RRP.** Representación de los valores cumulativos promedios de los EPSCs evocados respecto al tiempo (en negro se muestran los controles y en rojo los SCMs tratados con pregabalina). La pregabalina reduce el tamaño del RRP y la tasa de liberación lineal (R.R. *linear release rate*) del depósito de reciclaje a la mitad ( $6.8\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $3.0\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $n=10$ ). El valor de la tasa de liberación lineal se obtiene a partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida tras ajustar la fase estacionaria de las respuestas acumulativas a una función lineal. La velocidad de rellenado del RRP (R, *refill rate*) puede obtenerse a través de la relación R.R. / RRP. En presencia de la pregabalina no se modifica este parámetro ( $\sim 1.8\text{s}^{-1}$ ).

A continuación estudiamos si las subunidades  $\alpha 2\delta$  regulaban otras modalidades de liberación de neurotransmisores. En particular, si la unión de la pregabalina a las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 afectaba a la liberación asincrónica de neurotransmisores, fenómeno que sucede después del cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje. La liberación asincrónica proporciona una medida de la liberación global de las vesículas sinápticas en respuesta a un aumento importante de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, después del cierre de los canales de calcio presinápticos. Por ello, se hipotetiza que el sensor de calcio que regula la liberación asincrónica se encuentra más alejado de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ , comparado por ejemplo con los sensores rápidos de  $\text{Ca}^{2+}$  como la sinaptotagmina 1, capaces de responder a elevaciones locales de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se produce una elevación local de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal presináptico (Kaeser & Regehr, 2014). En este caso, no observamos diferencias entre antes y después de tratar los SCMs en agudo con la pregabalina (Figura 56), probablemente debido a que la unión de la pregabalina a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 no causó una reducción importante de la entrada de calcio global en el terminal presináptico (Figura 50).



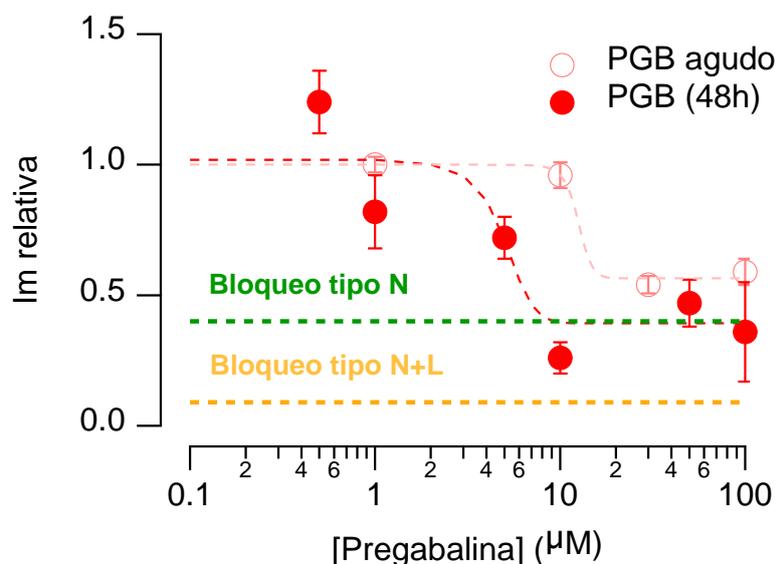
**Figura 56. Las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 sinápticas regulan exclusivamente la liberación sincrónica de neurotransmisores.** Diagrama de barras que muestran la ocurrencia de corrientes asincrónicas postsinápticas. El tiempo 0 corresponde con el final del tren de estímulos, utilizado para medir el tamaño del RRP. Los eventos se ajustan a una función exponencial simple con una constante de tiempo de 0.52s y 0.56s para la aparición de eventos asincrónicos antes y después de la exposición a 30 $\mu$ M pregabalina, respectivamente.

De forma conjunta, las evidencias descritas a lo largo de la tesis sugieren que la unión de la pregabalina a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 regula exclusivamente la liberación sincrónica de neurotransmisores, al no afectar otros tipos de neurotransmisión que ocurren cuando los canales de calcio presinápticos están cerrados como son la liberación asincrónica y la liberación espontánea (Figuras 56 y 43). Además, los resultados sugieren que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 contribuye a la selección de sitios de liberación preferenciales en las zonas activas, sin alterar los mecanismos usados por los terminales presinápticos para mantener el suministro de vesículas sinápticas durante una estimulación prolongada. La interacción de la pregabalina con  $\alpha 2\delta$ -1 produce un desacoplamiento entre los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N y la liberación de las vesículas sinápticas (Figura 52).

A modo de resumen podemos decir que: 1) La subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 regula de forma exclusiva la liberación sincrónica de neurotransmisores. 2) La interacción de la pregabalina con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 modifica la liberación del depósito de vesículas del RRP y la tasa de liberación lineal del depósito de reciclaje. 3) La velocidad de relleno de las vesículas sinápticas del RRP con vesículas del RP no se altera en presencia de la pregabalina. 4) En presencia de la pregabalina hay menos sitios de liberación que estén acoplados a los canales de calcio presinápticos.

## 2.4 Contribución de las subunidades $\alpha 2\delta$ -1 intracelulares y sinápticas a la regulación de la neurotransmisión.

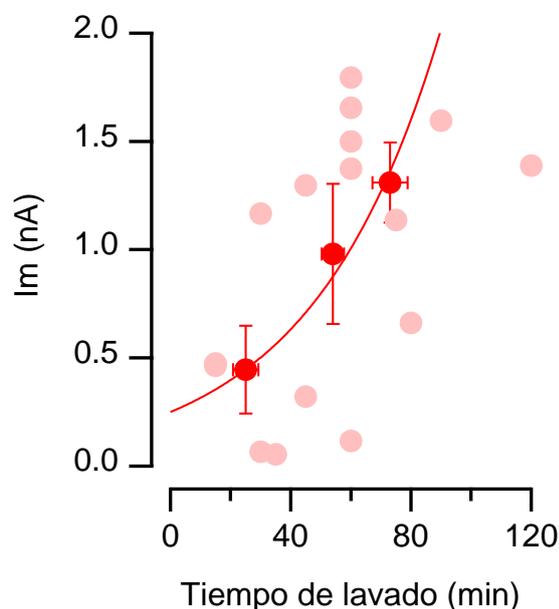
Debido a que una fracción de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 tiene una localización intracelular, a continuación consideramos estudiar la posible contribución de la fracción citoplasmática de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 en los efectos descritos. Para ello, tratamos los microcultivos con un rango de concentraciones de pregabalina (0.5-100 $\mu$ M) durante 48h y después registramos sus respuestas electrofisiológicamente. La exposición a la pregabalina de forma crónica causó un descenso de la  $IC_{50}$  en la amplitud de los EPSCs desde 11 $\mu$ M hasta 5 $\mu$ M. La inhibición máxima obtenida fue, sin embargo, comparable entre las condiciones crónica y aguda. La amplitud relativa de los EPSCs se redujo hasta  $0.47 \pm 0.09$  ( $n=13$ ,  $p<0.001$ ; Figura 57). Este descenso en la amplitud relativa de los EPSCs fue similar al obtenido después de tratar los SCMs con 3 $\mu$ M  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Figura 42).



**Figura 57. Dosis-dependencia de la pregabalina sobre la neurotransmisión.** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs al tratar los microcultivos neuronales con las concentraciones indicadas de pregabalina, aplicadas de forma aguda o bien 48h antes del registro. Las concentraciones de pregabalina en las neuronas tratadas de forma crónica se mantienen durante el registro electrofisiológico de las mismas. El bloqueo que produce la pregabalina en la neurotransmisión es similar al que ejerce la  $\omega$ -conotoxina, bloqueando los canales de calcio de tipo N.

Si el descenso observado en la  $IC_{50}$  estuviera relacionado con la interacción de la pregabalina con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 intracelulares, la interacción debería ser insensible al lavado de la pregabalina. Para verificar esta hipótesis, registramos los SCMs incubados con pregabalina durante 48h bajo perfusión continua de la solución externa en ausencia del fármaco. En los cubreobjetos en los cuales conseguimos registrar varios SCMs, observamos que la fuerza sináptica de las

neuronas expuestas a la pregabalina durante 48h recuperaban los valores de las neuronas controles (Figura 58). Esta recuperación de la fuerza sináptica hasta valores promedios de los controles se ajustó a una exponencial simple con una constante de tiempo de 50min (Figura 58). La ventana temporal observada en los SCMs fue casi idéntica a valores previos obtenidos para el efecto agudo de la gabapentina en neuronas del asta dorsal (Patel et al., 2000). Por ello, las diferencias observadas en la  $IC_{50}$  entre los tratamientos agudo y crónico no parecieron estar relacionados con una acción intracelular de la pregabalina sobre las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1. Por el contrario, es posible que tiempos de incubación más largos incrementasen la accesibilidad de la pregabalina a las subunidades  $\alpha 2\delta$  expresadas en la superficie de las zonas activas, reduciendo de esta forma el valor de la  $IC_{50}$ .

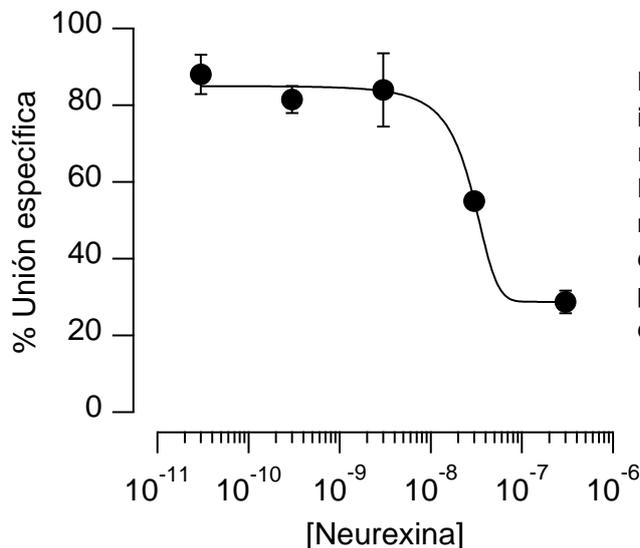


**Figura 58. La pregabalina sólo interacciona con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 sinápticas para modificar la neurotransmisión.** El efecto crónico de la pregabalina desaparece cuando la solución de registro extracelular no contiene el fármaco. Se muestran los datos de tres cubreobjetos diferentes que contenían  $\geq 4$  SCMs. Los datos de las neuronas individuales se ajustaron a una exponencial simple con una constante de tiempo de  $\sim 50$ min.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS ENDÓGENOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha 2\delta$ -1.

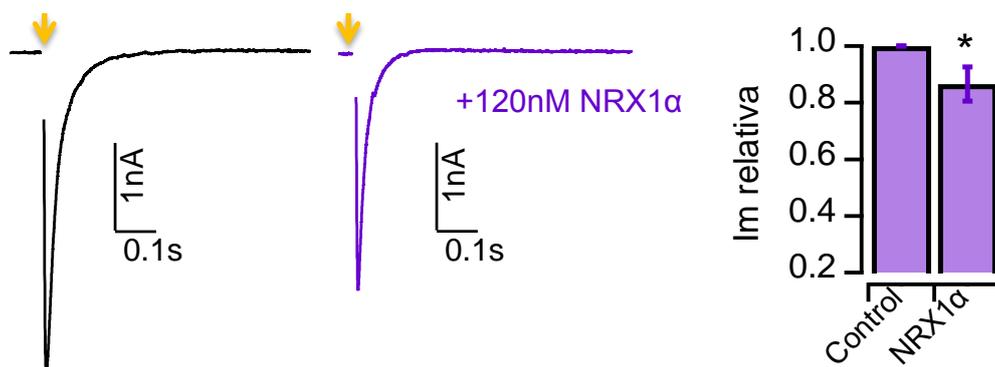
Para comprender mejor la regulación aguda ejercida por los gabapentinoides sobre la subunidad  $\alpha 2\delta$ , decidimos investigar el papel de un posible ligando endógeno, la neurexina-1 $\alpha$ , sobre la neurotransmisión en los microcultivos. Se ha descrito recientemente que el ectodominio de la NRX1 $\alpha$  se une a las diferentes subunidades  $\alpha 2\delta$ , mostrando la mayor afinidad por  $\alpha 2\delta$ -3, e inhibe la transmisión sináptica alterando la función de los canales de calcio de tipo N (Tong et al., 2017). Esta interacción aparece después del corte proteolítico de la NRX1 $\alpha$ , que causa la liberación del ectodominio. En primer lugar, para verificar si efectivamente el ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  interactuaba con  $\alpha 2\delta$ -1, llevamos a cabo ensayos de

unión a radioligando utilizando membranas preparadas a partir de células CHO transfectadas con el canal de calcio humano de tipo N (Cav2.2/ $\beta$ 3/ $\alpha$ 2 $\delta$ -1). De esta forma, comprobamos que la región extracelular recombinante de la NRX1 $\alpha$  de rata (Leu31-Thr1431) se unía a  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 con una IC<sub>50</sub> estimada de 140nM (Figura 59).



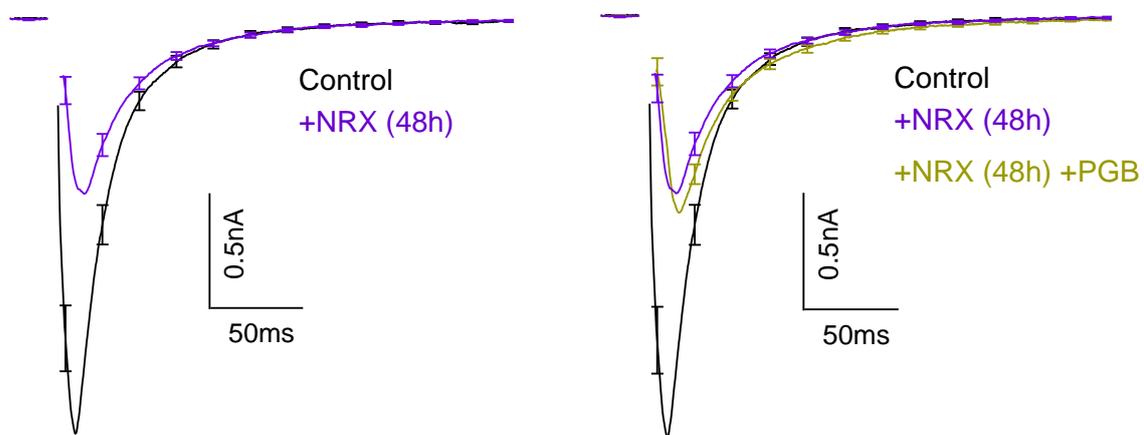
**Figura 59. El ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  interactúa con  $\alpha$ 2 $\delta$ -1.** El ensayo de unión a radioligando muestra que el ectodominio de la NRX1 $\alpha$  recombinante desplaza a la gabapentina marcada (<sup>3</sup>H]-gabapentina) con una IC<sub>50</sub> estimada de 140nM. Se muestran los valores promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  error estándar.

Una vez comprobamos que el ectodominio de la NRX1 $\alpha$  se unía a  $\alpha$ 2 $\delta$ -1, procedimos a averiguar su efecto sobre la neurotransmisión utilizando como plataforma de estudio los microcultivos neuronales. En este caso, comprobamos que la exposición de la NRX1 $\alpha$  de forma aguda en un rango de concentraciones entre 15 y 120nM redujo moderadamente la transmisión sináptica en  $\sim$ 15% (n=6, p<0.04; Figura 60).



**Figura 60. La exposición del ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  de forma aguda en los SCMs reduce la neurotransmisión.** Se muestra un ejemplo de las respuestas sinápticas obtenidas después de exponer a un microcultivo neuronal con NRX1 $\alpha$  a una concentración de 120nM durante 20 minutos. El diagrama de barras muestra los valores promedio y las barras de error el error estándar en las condiciones indicadas (n=6; \*p<0.04).

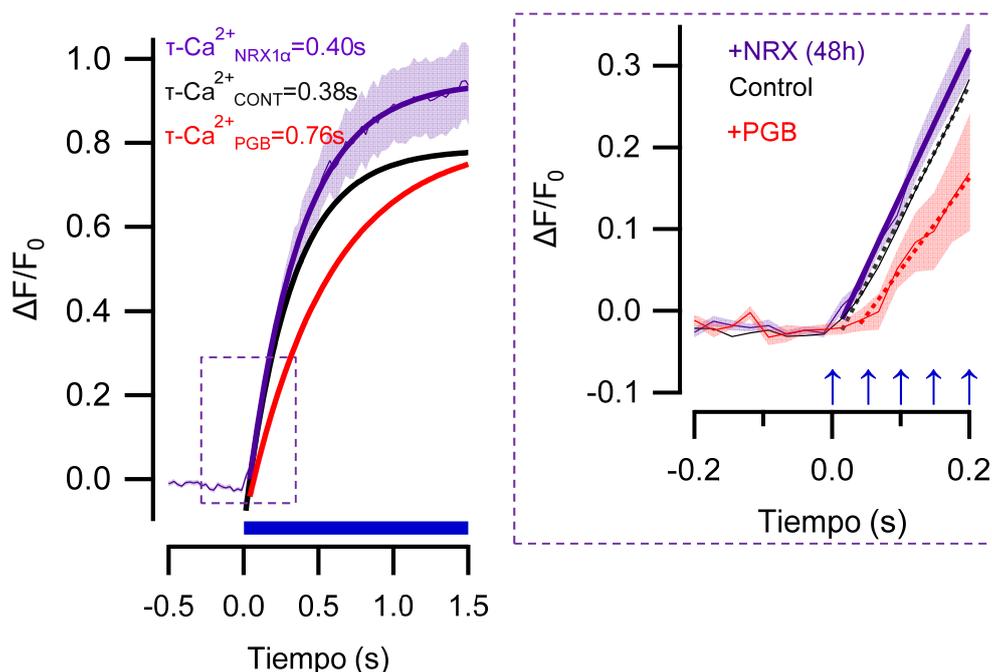
Al observar un mínimo efecto de la NRX1 $\alpha$  sobre la transmisión sináptica durante su exposición en agudo (15-20min), consideramos la posibilidad de prolongar el tiempo de incubación para comprobar si así alcanzábamos un efecto más relevante, tal y como habíamos observamos con la pregabalina. De esta forma, comprobamos que la incubación de los cultivos celulares durante 48h con el péptido recombinante (10nM) redujo la amplitud relativa de los EPSCs a  $0.51 \pm 0.07$  ( $n=22$ ,  $p < 0.001$ ). Observamos también que este nivel de inhibición no disminuyó tras la aplicación simultánea de la pregabalina en agudo ( $I_m$  relativa =  $0.49 \pm 0.07$ ,  $n=10$ ) (Figura 22).



**Figura 61. Acciones del ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  sobre la neurotransmisión.** Valores promedio de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSCs) en las condiciones indicadas. Los trazos indican los valores promedios  $\pm$ error estándar. Observamos que la exposición durante 48h de la NRX1 $\alpha$  en los SCMs disminuye la amplitud los EPSCs  $\sim$ 50%. Además, la exposición simultánea de la NRX1 $\alpha$  (10nM durante 48h) junto a la pregabalina (30 $\mu$ M en agudo) produce un descenso en la amplitud de los EPSCs similar al efecto que produce la NRX1 $\alpha$  sola.

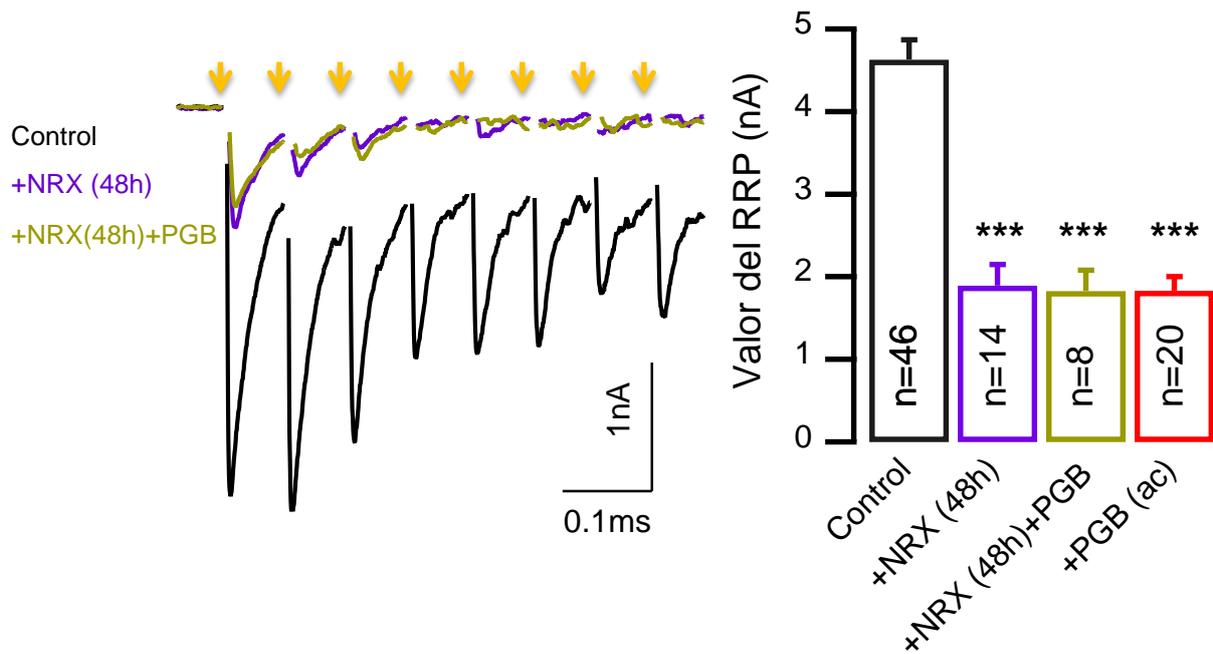
A continuación, para discriminar el efecto de la NRX1 $\alpha$  sobre la entrada de calcio presináptico, utilizamos de nuevo el indicador SyGAMP6f y realizamos registros de fluorescencia. De esta manera, monitorizamos el comportamiento de la entrada de calcio presináptico en presencia de la NRX1 $\alpha$  (10nM) aplicada de forma crónica durante 48h en los cultivos neuronales. En este caso, observamos que el ectodominio recombinante de la NRX1 $\alpha$  no causó ningún descenso en el flujo de entrada de calcio presináptico ni tampoco modificó la cinética de entrada de calcio presináptico. Además, analizando los cambios relativos en la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f durante los primeros 200ms de la estimulación a 20Hz, periodo durante el cual se liberan esencialmente las vesículas del RRP,

comprobamos que la exposición de los SCMs con la NRX1 $\alpha$  no generó ningún descenso relativo en la entrada de calcio presináptico.



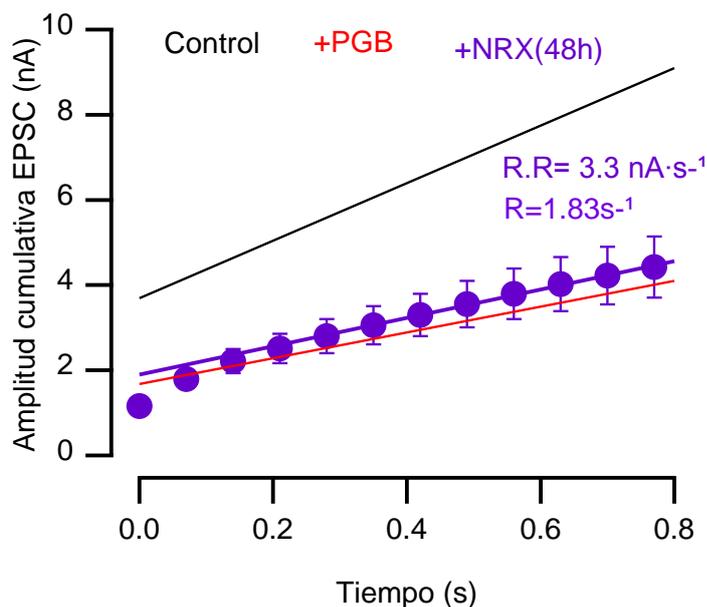
**Figura 62. La NRX1 $\alpha$  no modifica el flujo de entrada de calcio presináptico.** Se muestran los cambios relativos de fluorescencia del indicador SyGCaMP6f en las condiciones indicadas. Los trazos indican valores promedios  $\pm$  error estándar de la NRX1 $\alpha$  aplicada durante 48h a una concentración de 10nM en los SCMs ( $n=10$ ). Los cambios relativos de la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f ( $\Delta F/F_0 \sim 100\%$ ) no se vieron afectados durante la aplicación de un tren de 30 estímulos a 20Hz. Observar también que durante la aplicación de los cinco primeros pulsos despolarizantes (200ms iniciales), no se observa ninguna reducción en los cambios relativos de la fluorescencia del indicador SyGCaMP6f. Los cambios relativos en la fluorescencia se ajustan a una función lineal ( $r^2=0.99$ ), indicando que los canales de calcio voltaje dependientes no se encuentran inactivados durante el periodo de tiempo indicado. La constante de tiempo para el incremento de calcio presináptico durante la estimulación es de  $\sim 397$ ms, prácticamente idéntica a la de las neuronas sin tratar (384ms).

Después de haber observado un descenso en la eficiencia de liberación del RRP y del RP en presencia de la pregabalina en los SCMs (Figura 55), a continuación decidimos averiguar la acción que producía la NRX1 $\alpha$  en este sentido. El análisis de las respuestas postsinápticas mostró que la NRX1 $\alpha$  ejerció una acción similar a la de la pregabalina de nuevo: La unión del ectodominio recombinante de la NRX1 $\alpha$  a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 produjo un descenso en la liberación del RRP, hasta valores de  $0.43 \pm 0.05$  ( $n=14$ ,  $p<0.001$ ). Además, en términos del valor del RRP, la acción aguda de la pregabalina tampoco se vio añadida al efecto ejercido por la NRX1 $\alpha$  aplicada de forma crónica (Figura 63).



**Figura 63. El ectodominio de NRX1 $\alpha$  modifica el tamaño del depósito de liberación rápida (RRP) de forma idéntica a la pregabalina.** Ejemplos representativos donde se muestran las primeras respuestas postsinápticas tras la aplicación de un tren de estímulos en las condiciones indicadas. El diagrama de barras muestra el resumen de los valores del tamaño del depósito de vesículas de liberación rápida (RRP) en las condiciones indicadas. Se observa que el tratamiento simultáneo con la pregabalina no modifica el valor del tamaño del RRP. Los datos indican valores promedios  $\pm$  error estándar (\*\*\*) $p < 0.001$ .

Asimismo, la tasa de liberación del depósito de reciclaje también disminuyó en presencia de la NRX1 $\alpha$  desde  $6.8 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1}$  hasta  $3.3 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1}$  y, de forma similar a la acción de la pregabalina, la velocidad de rellenado de las vesículas del RRP fue comparable al valor obtenido en los controles (Figura 64).

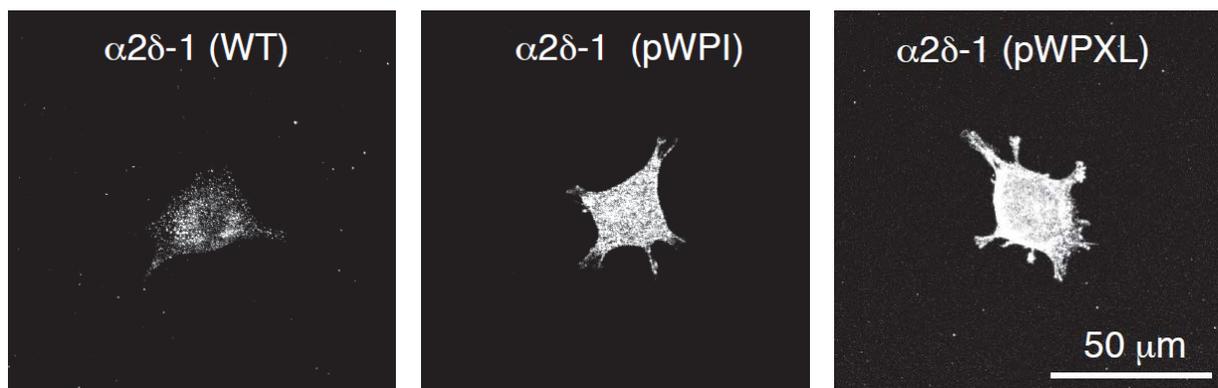


**Figura 64. El ectodominio de NRX1 $\alpha$  afecta a la liberación del tamaño del depósito de liberación rápida (RRP) y del depósito de reciclaje (RP).** El ectodominio de NRX1 $\alpha$  reduce el tamaño del RRP y la tasa de liberación lineal (R.R *linear release rate*) del depósito de reciclaje ( $\text{nA} \cdot \text{s}^{-1}$ ). La velocidad de rellenado del RRP (R, *refill rate*) no se modifica. Observar la similitud entre la acción de la neurexina-1 $\alpha$  y la acción en agudo de la pregabalina.

#### 4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE $\alpha 2\delta$ -1 Y LA REGULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN.

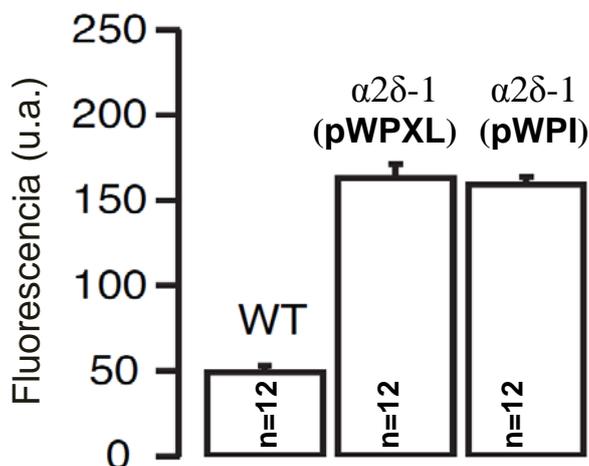
De forma conjunta, todas las evidencias descritas durante el desarrollo de la tesis sugieren que tanto los gabapentinoides como el ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  compiten por el mismo sitio de unión en la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 para regular la liberación sincrónica de neurotransmisores. Sin embargo, ya que en los SCMs se encuentran presentes otras dos isoformas de la subunidad  $\alpha 2\delta$  (Figura 40), ¿podemos asegurar que las acciones ejercidas tanto por los gabapentinoides como por el ligando endógeno NRX1 $\alpha$ , son mediadas en exclusiva por su unión a  $\alpha 2\delta$ -1?

Para demostrar esta hipótesis, decidimos sobreexpresar la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en los microcultivos, utilizando de nuevo como herramienta los lentivirus. Para ello, generamos dos lentivirus que sobreexpresaron la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, clonando esta subunidad en dos plásmidos diferentes: pWPXL y pWPI (ver apartado 4 de materiales y métodos). En primer lugar, para validar los sistemas de sobreexpresión infectamos células HEK-293T con los dos lentivirus durante ~16horas y después realizamos ensayos de inmunofluorescencia que nos permitieron observar el patrón de expresión de la proteína. Observamos así que las células HEK-293T presentaban niveles basales de expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 bajos (WT) y que sus niveles de expresión aumentaban de forma evidente el día siguiente de haber realizado la infección (Figura 65).



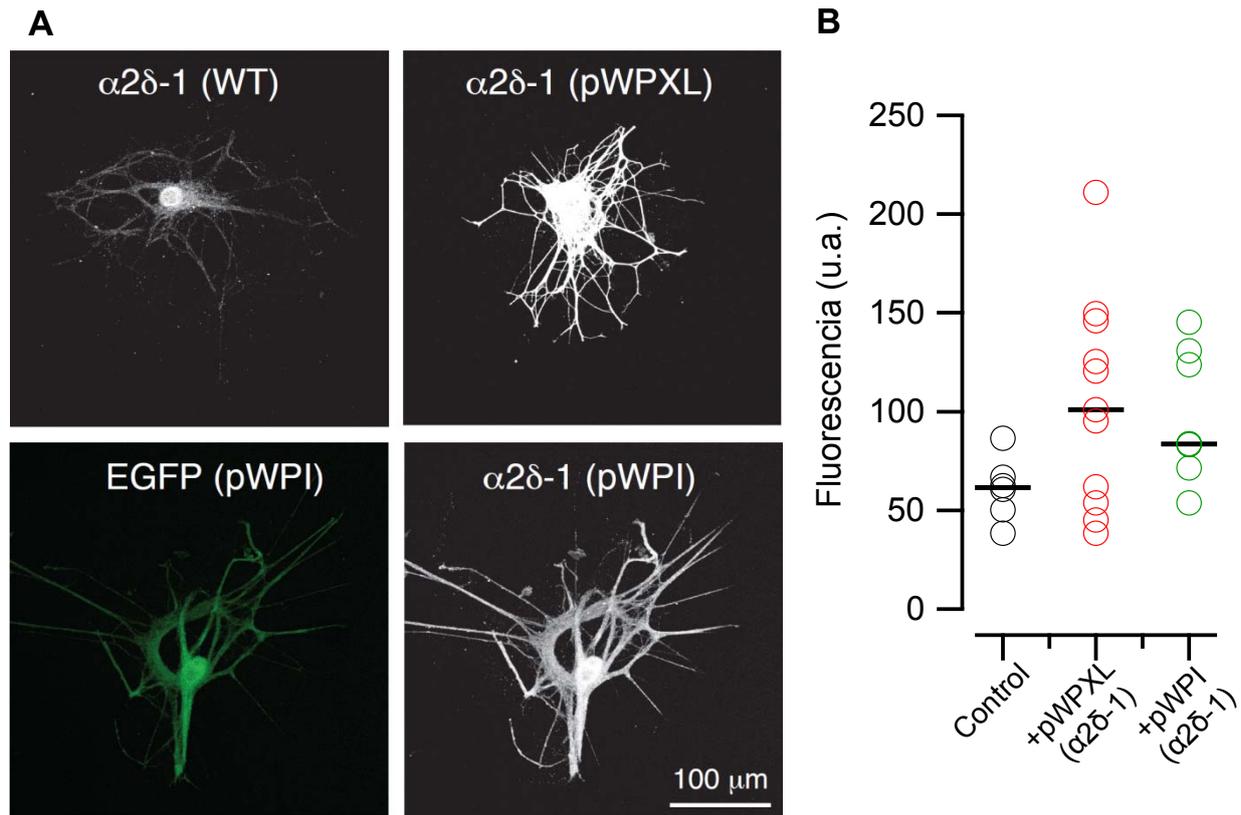
**Figura 65. Validación de los sistemas de sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1.** Patrón de expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 en células HEK-293T no infectadas (WT) y en células HEK-293T infectadas con los lentivirus generados (pWPXL+ $\alpha 2\delta$ -1 y pWPI+ $\alpha 2\delta$ -1) durante ~16horas. En las imágenes se observa de forma evidente un incremento en la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 utilizando los dos sistemas de sobreexpresión. El ensayo de inmunofluorescencia se realizó utilizando el anticuerpo anti- $\alpha 2\delta$ -1 de la compañía Lifespan Biosciences (dilución 1:1000).

Después de adquirir las imágenes, realizamos un análisis cuantitativo sobre los niveles de fluorescencia observados. De esta forma comprobamos que la infección de las células HEK-293T con los lentivirus que sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 produjo un incremento superior a 3 veces en la expresión de la proteína (Figura 66).



**Figura 66. Incremento en la expresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en células HEK-293T utilizando los sistemas de sobreexpresión.** Se observa un aumento superior a 3 veces en la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 al cabo de aproximadamente un día utilizando los dos sistemas de sobreexpresión. Para realizar el análisis cuantitativo de los niveles de fluorescencia, la adquisición de las imágenes se llevó a cabo utilizando siempre los mismos ajustes.

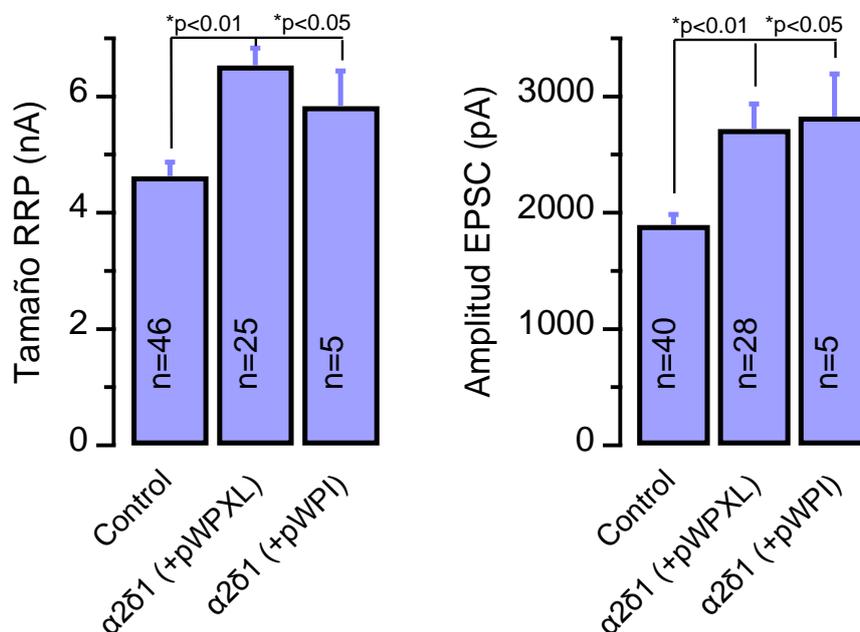
A continuación, validamos los sistemas de sobreexpresión en los SCMs. En el ejemplo de la Figura 67 observamos que la infección de los microcultivos con los lentivirus generó al cabo de 5-6 días un aumento evidente en la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1, de manera similar a lo observado en las líneas celulares (Figura 65). No obstante, al adquirir las imágenes para realizar el análisis cuantitativo de los niveles de fluorescencia, observamos que los SCMs presentaban niveles de expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 variables. En algunos SCMs los niveles de expresión de la proteína aumentaron hasta ~4 veces, utilizando el sistema de sobreexpresión generado a partir del plásmido pWPXL+CaV $\alpha 2\delta$ 1, mientras que otros SCMs presentaban niveles de  $\alpha 2\delta$ -1 similares a los de los SCMs no infectados. El lentivirus generado a partir del plásmido pWPI llevaba acoplado como indicador interno de la sobreexpresión a la proteína fluorescente EGFP y, por tanto, nos permitió observar si todos los SCM estaban infectados. De esta forma, comprobamos que los SCMs que que mostraban una clara expresión de GFP se correspondían con aquellos que presentaban unos niveles de sobreexpresión más elevados de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 (Figura 67).



**Figura 67. Los SCMs sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 utilizando dos sistemas de sobreexpresión diferentes. A)** Patrón de expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 en los microcultivos no infectados (WT) y en SCMs infectados con los dos lentivirus generados para modificar genéticamente a los microcultivos. El marcaje obtenido por el anticuerpo anti- $\alpha 2\delta$ -1 (1:1000, Lifespan Bioscience) es específico. En las imágenes se observa un incremento evidente de la fluorescencia en los procesos neurales de los SCMs a los 5-6 días de realizar la infección. **B)** Se muestran los niveles de expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en SCMs individuales (controles: n=6; +pWPXL: n=11; +pWPI: n=8). El promedio en el aumento de la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 es ~2 veces. Se observa que la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 es muy variable entre las neuronas individuales, expresando algunos SCMs 4 veces más de proteína respecto al promedio de los controles.

Después analizamos si la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 generó algún cambio funcional en los microcultivos. Las subunidades  $\alpha 2\delta$  han sido descritas como organizadores sinápticos, acoplado la entrada de calcio con la liberación de vesículas (Hoppa et al., 2012). Su expresión establece la probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas, tal y como se ha descrito sobreexpresando las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1, 2 y 3 en neuronas hipocámpales (Hoppa et al., 2012). Por ello, decidimos comprobar si la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 modificaba el tamaño del RRP en los SCMs. Observamos que los dos sistemas de sobreexpresión modificaban funcionalmente el tamaño del depósito de liberación rápida, al comprobar que se produjo un aumento en el valor del RRP (Figura 68). El lentivirus generado a partir del plásmido pWPXL-CaV $\alpha 2\delta$ 1 modificó el valor del RRP ~40% en

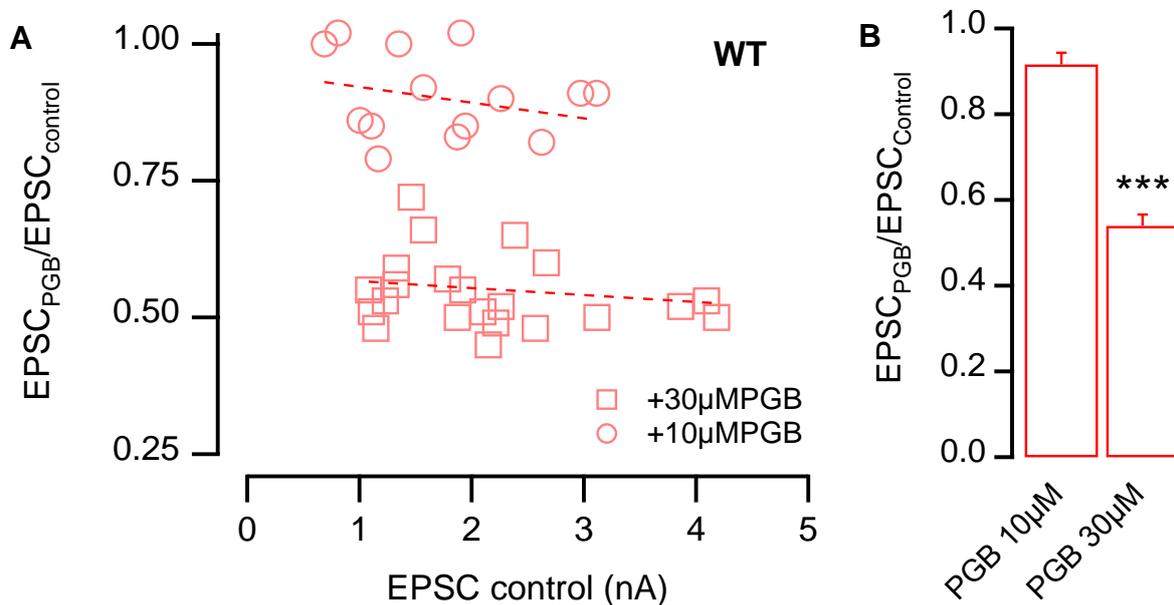
los SCMs (n=18). En el caso del lentivirus generado a partir del plásmido pWPI-CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 el aumento fue del ~26% (n=5). Además, observamos que los SCMs que sobreexpresaban  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 generaban EPSCs anormalmente grandes, aumentando significativamente su tamaño, en promedio más 40% (Figura 68).



**Figura 68. La sobreexpresión de la subunidad  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 aumenta el tamaño del RRP.** La sobreexpresión de  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 produce un efecto funcional en los SCMs, al modificar el tamaño del depósito de liberación rápida, RRP. El lentivirus que sobreexpresa la subunidad  $\alpha$ 2 $\delta$ 1 en el plásmido pWPXL genera un aumento ~40% en el valor del RRP en los SCMs mientras que el segundo lentivirus utilizado (pWPI+ $\alpha$ 2 $\delta$ 1) modifica el valor del RRP en ~26%. La sobreexpresión también genera un aumento del tamaño de los EPSCs >40% utilizando los dos sistemas de sobreexpresión (pWPXL+ $\alpha$ 2 $\delta$ 1: p<0.01; pWPI+ $\alpha$ 2 $\delta$ 1: p<0.05).

En resumen, al infectar los SCMs con lentivirus que sobreexpresaban la subunidad  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 observamos un incremento en la expresión de la proteína  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 (Figura 67) y comprobamos que el aumento en la expresión de  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 producía un efecto funcional en los SCMs, modificando el tamaño de su depósito de liberación rápida (Figura 68). A continuación, decidimos comparar la acción ejercida por la pregabalina sobre la neurotransmisión entre las neuronas que expresaban niveles basales de  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 (SCMs sin infectar) y las neuronas que sobreexpresaban de forma específica la subunidad  $\alpha$ 2 $\delta$ -1. Utilizamos para ello el lentivirus generado a partir del plásmido pWPXL- $\alpha$ 2 $\delta$ -1. En el caso de las neuronas que presentaban niveles basales de  $\alpha$ 2 $\delta$ -1, comprobamos que la inhibición que ejerció la pregabalina sobre las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC<sub>PGB</sub> / EPSC<sub>control</sub>) fue independiente de la amplitud inicial de los EPSCs, observando que se producía una reducción de los EPSCs ~50% a una concentración de 30 $\mu$ M (n=22), independientemente del

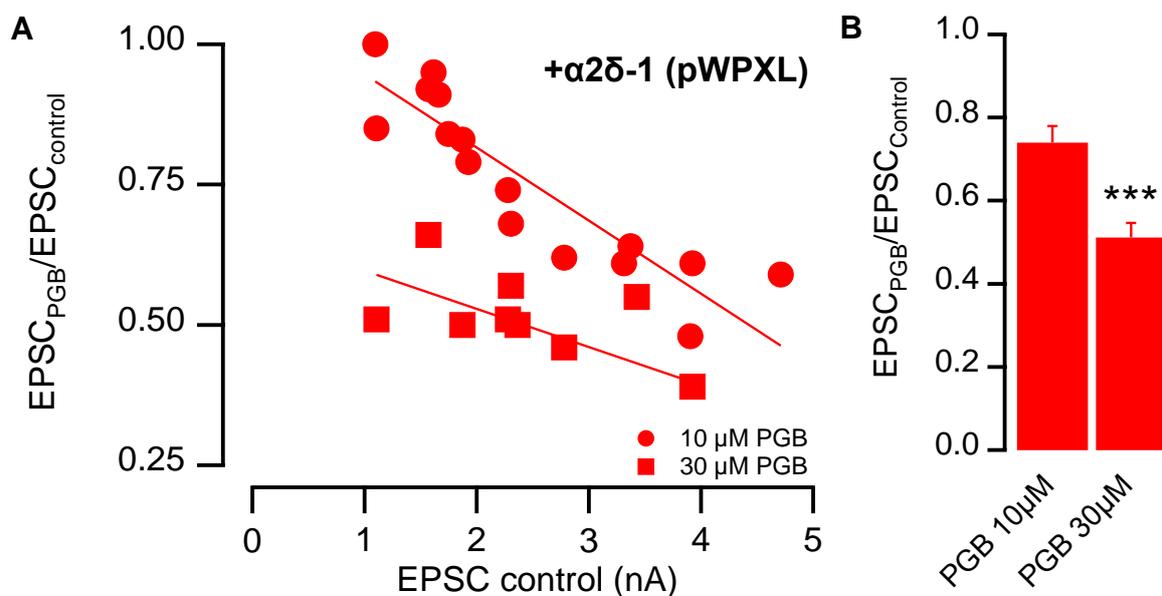
tamaño inicial del EPSC. Además, la aplicación de una concentración aguda de  $10\mu\text{M}$  no disminuyó la amplitud de las corrientes excitatorias de forma significativa ( $I_m \text{ relativa} = 0.91 \pm 0.03$ ).



**Figura 69. Relación entre la inhibición de las corrientes en presencia de la pregabalina en agudo y el tamaño inicial de los EPSC registrados. A)** La inhibición de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) ejercida por la pregabalina es independiente de la amplitud inicial de los EPSCs. Se muestra la inhibición que produce la pregabalina a cada neurona a las concentraciones indicadas. **B)** La pregabalina aplicada de forma aguda produce una inhibición de las corrientes ~ 50% a una concentración de  $30\mu\text{M}$  ( $0.54 \pm 0.03$ ;  $n=22$ ). PGB  $10\mu\text{M}$ :  $0.92 \pm 0.03$ ;  $n=13$ . La inhibición se mide como:  $\text{EPSC}_{\text{PGB}} / \text{EPSC}_{\text{CONTROL}}$ .

De forma diferencial, la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta-1$  provocó que los SCMs se volviesen más sensibles a la pregabalina (Figura 70). Observamos que al aumentar el número de copias funcionales de la subunidad  $\alpha 2\delta-1$  en los SCMs, concentraciones más bajas de la pregabalina ( $10\mu\text{M}$ ) producían una inhibición de la neurotransmisión ( $I_{m\text{rel}} = 0.74 \pm 0.04$ ;  $n=16$ ), que antes no observábamos (Figura 69). Comprobamos que la acción de la pregabalina dependía de los niveles de expresión de la subunidad  $\alpha 2\delta-1$ , al existir una relación lineal entre el tamaño inicial de las corrientes y la inhibición en la neurotransmisión ( $r^2 = 0.79$ ). Como se observa en la Figura 70, la pregabalina inhibió de forma más acusada la neurotransmisión en los SCMs que inicialmente presentaban corrientes más grandes (EPSCs  $>3\text{nA}$ ). Esto fue debido probablemente a que los SCMs presentaban niveles de expresión de  $\alpha 2\delta-1$  mayores y por ello, fueron más sensibles a la acción de la pregabalina. Por el contrario, también observamos que los SCMs que no respondieron a la aplicación en agudo de una concentración de  $10\mu\text{M}$  pregabalina, tenían corrientes iniciales más pequeñas

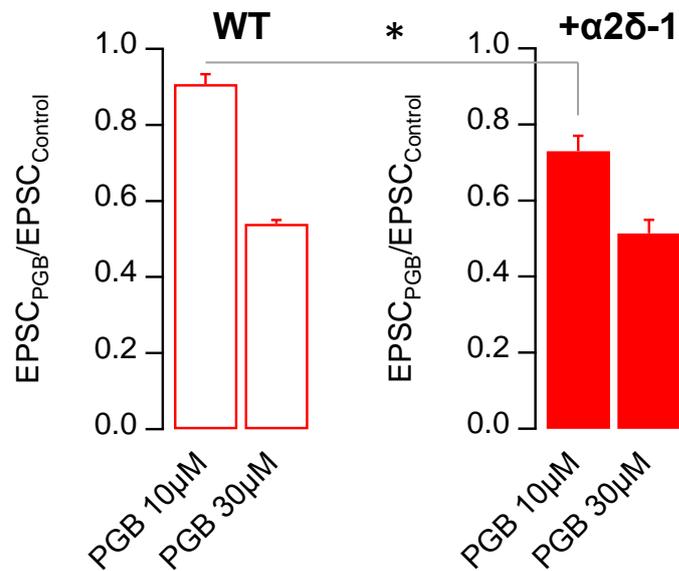
que recordaban a las de las neuronas sin infectar (EPSCs  $\leq 2$ nA). Probablemente estos SCMs presentaban unos niveles 'basales' de  $\alpha 2\delta$ -1. La aplicación de una concentración mayor de pregabalina (30 $\mu$ M) alcanzó unos niveles máximos de inhibición ~60% en los SCMs que sobreexpresaban  $\alpha 2\delta$ -1, niveles similares a los alcanzados cuando bloqueábamos la neurotransmisión con la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Figura 41).



**Figura 70. La acción de la pregabalina es sensible al aumento en la expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en los SCMs.** **A)** La inhibición de las corrientes excitatorias postsinápticas en presencia de la pregabalina es sensible a la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$ -1 y depende de la amplitud inicial de los EPSCs. Se observa que cuando las neuronas expresan un mayor número de copias de  $\alpha 2\delta$ -1, la inhibición que produce la pregabalina es mayor. Los registros individuales de cada neurona muestran que existe una relación lineal entre la inhibición de la neurotransmisión que ejerce la PGB con el tamaño de los EPSCs iniciales (PGB 10 $\mu$ M:  $r^2=0.79$ ; PGB 30 $\mu$ M:  $r^2=0.54$ ). El efecto es menos marcado a una concentración de 30 $\mu$ M, alcanzando niveles de inhibición de los EPSCs iniciales del ~60%. **B)** La pregabalina aplicada de forma aguda produce una inhibición en la neurotransmisión ~ 50% a una concentración de 30 $\mu$ M (Imrel=0.51 $\pm$ 0.03; n=9) y ~ 25% a una concentración de 10 $\mu$ M (Imrel=0.74 $\pm$ 0.04; n=16).

Por tanto, utilizando dos sistemas de sobreexpresión diferentes comprobamos que los niveles de expresión de  $\alpha 2\delta$ -1 en los SCMs aumentaron y que la modificación genética de las neuronas con los lentivirus produjo un aumento en el valor del RRP. Además, comparando la acción que ejerció la pregabalina en neuronas sin infectar y en las neuronas infectadas con los lentivirus que sobreexpresaban  $\alpha 2\delta$ -1, observamos que cuanto mayor era el número de copias de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 que sobreexpresaban los SCMs, más sensible se volvía la neurona a la acción de la pregabalina (Figura 70). Por ello, concluimos que la acción que ejerció la pregabalina regulando la neurotransmisión de forma aguda estaba

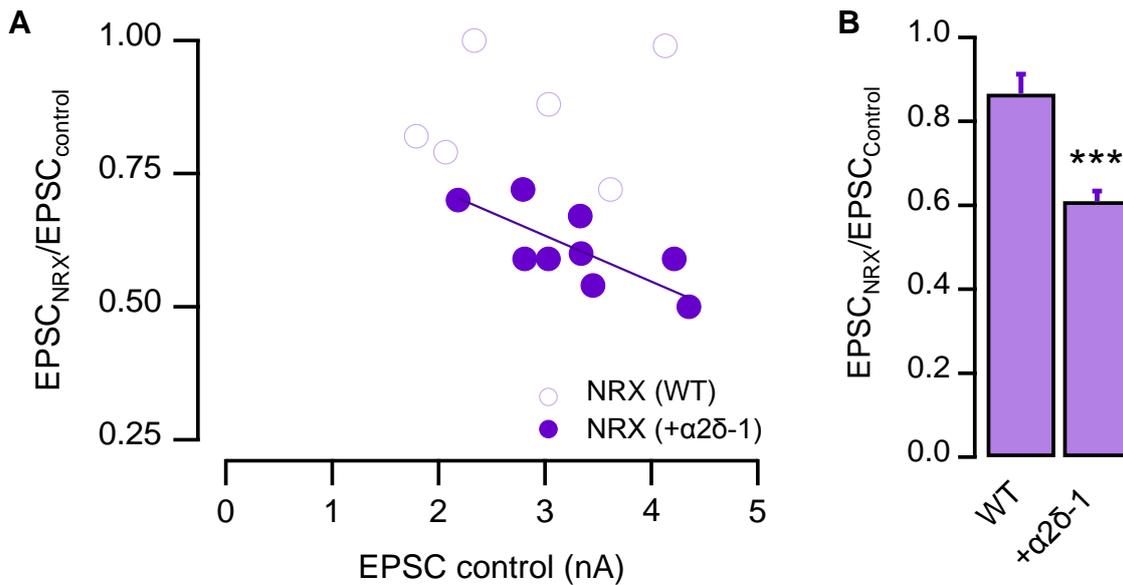
mediada por su unión a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 y dependió probablemente del número de copias de  $\alpha 2\delta$ -1 que se expresasen a nivel sináptico.



**Figura 71.** La subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 es la responsable del descenso en la neurotransmisión observado en los SCMs en presencia de la pregabalina. Los SCMs se vuelven sensibles a concentraciones menores de pregabalina cuando sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 (PGB 10μM: \* $p < 0.003$ ).

Por último, comparamos el efecto que ocasionó la presencia del ectodominio de la NRX1 $\alpha$  (Leu31-Thr1431) en las neuronas que presentaban niveles basales de  $\alpha 2\delta$ -1 (SCMs sin infectar) y en las neuronas que sobreexpresaban la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1. En contraposición a lo observado cuando describimos que la NRX1 $\alpha$  ejercía una mínima acción sobre la neurotransmisión en agudo (Figura 60), comprobamos que la aplicación del ectodominio recombinante de la NRX1 $\alpha$  sí produjo una inhibición clara de la transmisión sináptica en agudo en aquellas neuronas que sobreexpresaban  $\alpha 2\delta$ -1, utilizando una concentración de 65nM. Los valores de los EPSC se redujeron a  $0.61 \pm 0.02$  ( $n=9$ ,  $p < 0.001$ ). Por lo tanto, la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$ -1 incrementó la capacidad de la neurexina-1 $\alpha$  de ejercer una acción reguladora aguda.

Este efecto puede explicarse debido a que cuando sobreexpresábamos las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1, éstas presentaban una mayor accesibilidad en las sinapsis y por tanto, el tiempo necesario para que la neurexina-1 $\alpha$  se uniese a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se redujo, observando así su acción en agudo. Además, observamos que cuanto mayor era el tamaño de los EPSCs iniciales en los SCMs, probablemente como consecuencia de la inserción de un mayor número de copias de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en las sinapsis, el efecto de la NRX1 $\alpha$  se volvía más acusado (Figura 72), de forma similar a lo observado con la pregabalina.



**Figura 72. La acción del ectodominio recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  en agudo es sensible a la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1. A)** Cuando infectamos los SCMs con lentivirus que sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 observamos que la NRX1 $\alpha$  produce un efecto inhibitorio sobre los EPSCs a una concentración de 65nM en agudo. Se observa que existe una relación lineal entre el tamaño inicial de los EPSCs y la inhibición en la neurotransmisión que produce la NRX1 $\alpha$  ( $r^2=0.74$ ). **B)** Las neuronas que sobreexpresan la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se vuelven sensibles a la acción de la NRX1 $\alpha$  en agudo ( $Imrel=0.61\pm 0.02$ ,  $n=9$ ;  $p<0.001$ ).

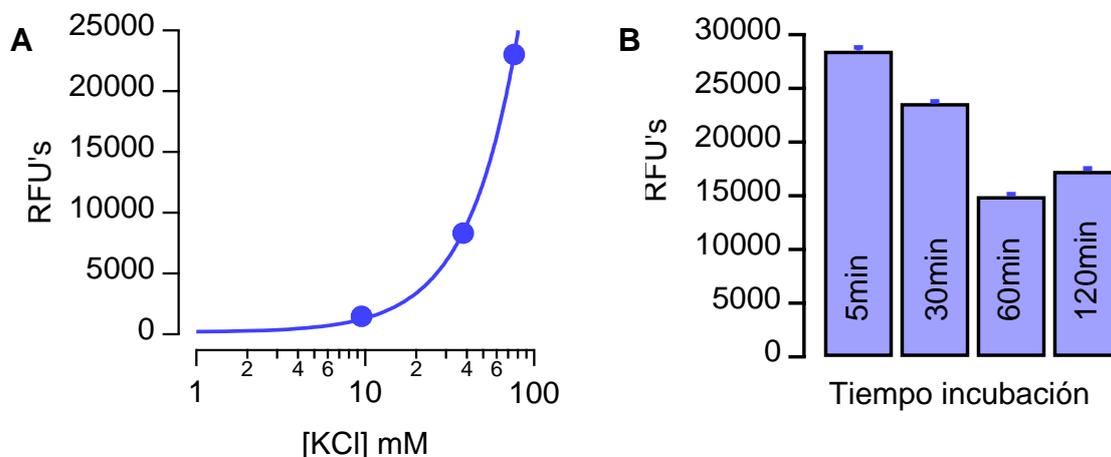
En conclusión, podemos afirmar que la pregabalina y el ectodominio recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  compiten por el mismo sitio de unión en la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 para regular la liberación sincrónica de neurotransmisores.

## 5. OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO FLUORIMÉTRICO DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO PARA EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DEL CANAL IÓNICO VOLTAJE DEPENDIENTE Cav2.2.

Para el estudio del segundo objetivo de la tesis pusimos a punto un ensayo fluorimétrico de movilización de calcio sobre el canal de calcio voltaje-dependiente Cav2.2. A través de este ensayo pudimos detectar el flujo de entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la línea celular que sobreexpresa el canal de calcio Cav2.2, utilizando el indicador fluorescente de calcio *Calcium6*, después de aplicar un estímulo despolarizante con una alta concentración de KCl a las células (Benjamin et al., 2006; Lubin et al., 2006; Finley et al., 2010; Figura 39). La principal ventaja de esta aproximación fue que nos permitió monitorizar de forma fiable y rápida la acción de miles de compuestos sobre una diana concreta, posibilitando el cribado de la librería de compuestos de Laboratorios Esteve para identificar nuevos compuestos con potencial interés farmacológico que actuaran inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal de calcio Cav2.2.

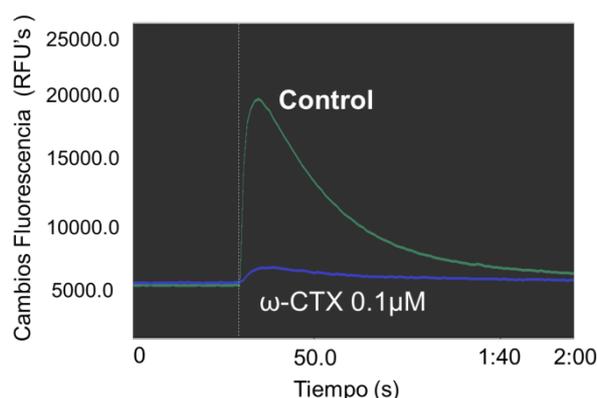
En primer lugar, para la puesta a punto del ensayo optimizamos tres parámetros: **1)** la concentración de KCl con la que estimular a las células para obtener una ventana de trabajo suficiente que nos permitiese realizar el cribado de la quimioteca, **2)** el tiempo de incubación necesario del indicador de calcio intracelular con el cual obtener una ventana de trabajo óptima y **3)** la influencia del tiempo de incubación de los compuestos sobre la actividad funcional de los mismos. Tal y como está descrito en la literatura, la adición de concentraciones crecientes de KCl extracelular produjo un incremento en el flujo de entrada de calcio (Lubin et al., 2006; Vortherms et al., 2011; Figura 73A). Durante el desarrollo del ensayo decidimos utilizar una concentración final de  $\text{K}^+$  en el pocillo de 38mM (60.2mM en el tampón de estimulación) para despolarizar las células. Además, analizamos la relación entre el tiempo de incubación del colorante intracelular de calcio y la señal de fluorescencia obtenida (RFU's o cambios en la fluorescencia, medidos como:  $F-F_0$ ). El análisis de las respuestas mostró que las células toleraron tiempos de incubación con el colorante de al menos 2h (Figura 74B). No obstante, obtuvimos una ventana de fluorescencia mayor con tiempos de incubación más cortos del colorante de calcio. Debido a que tiempos de incubación largos podrían afectar a la viabilidad celular (Lubin et al., 2006), decidimos utilizar un tiempo de incubación del

indicador de calcio intracelular de 30 minutos para realizar el cribado de la quimioteca.



**Figura 73. Optimización del ensayo fluorimétrico de movilización de calcio.** Cambios en la fluorescencia en función de la concentración de KCl en el tampón de estimulación (A) y del tiempo de incubación del indicador de calcio intracelular *Calcium6* (B).

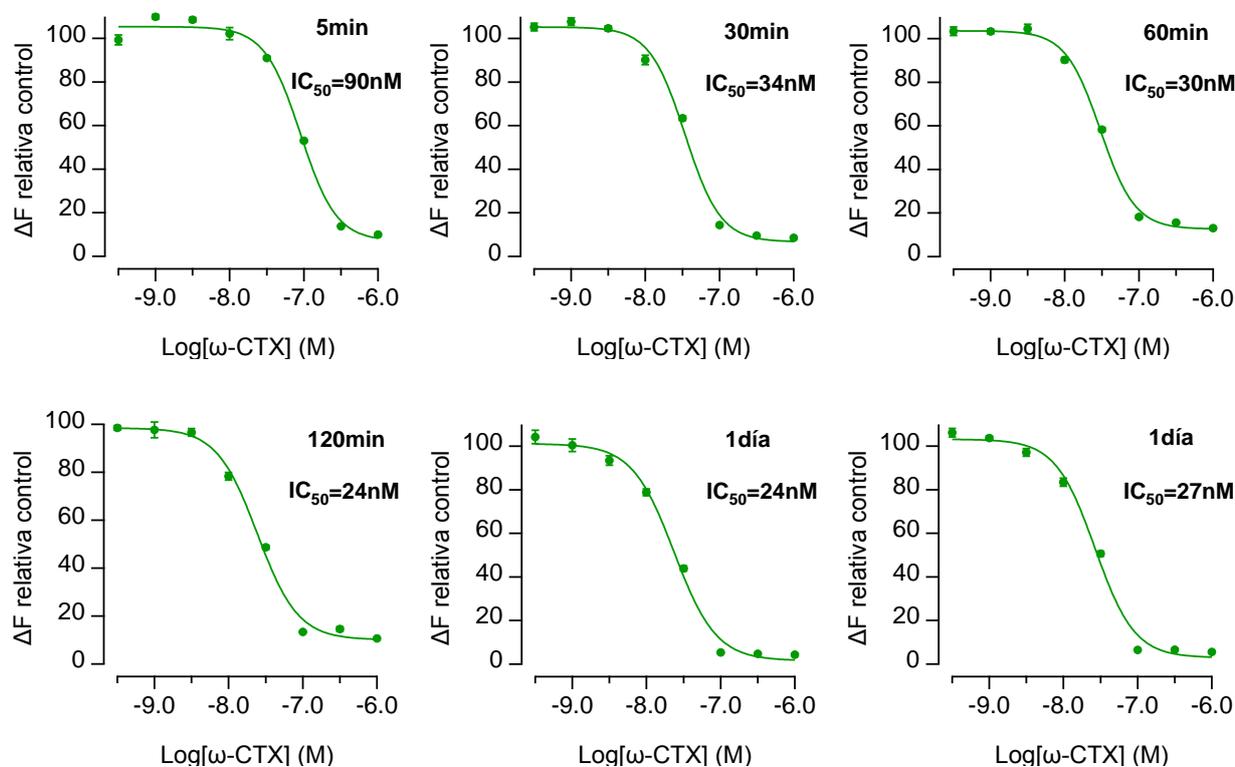
Por otra parte, estudiamos la influencia del tiempo de incubación de los compuestos sobre la actividad funcional de los mismos. En el ensayo el control positivo se definió como la actividad total del canal de calcio  $Ca_v2.2$  en ausencia de cualquiera de los compuestos; mientras que el control negativo se estableció a partir de la inhibición completa del canal de calcio voltaje-dependiente de tipo N usando la  $\omega$ -conotoxina-GVIA a una concentración de  $0.1\mu M$  (Figura 74).



**Figura 74. Flujo de calcio evocado por un estímulo con una alta concentración de  $K^+$ .** Los cambios en la fluorescencia indican la actividad total del canal de calcio  $Ca_v2.2$ , que podemos bloquear utilizando la neurotoxina peptídica  $\omega$ -conotoxina GVIA, un bloqueante selectivo del canal  $Ca_v2.2$ .

De esta forma, establecimos que el tiempo de incubación mínimo de los compuestos para presentar una farmacología adecuada fue de 30 minutos. Este valor se determinó analizando las variaciones de la  $IC_{50}$ . Realizamos curvas dosis-respuesta incubando las células con concentraciones crecientes de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA, que fue utilizada como control negativo al ser un bloqueante selectivo del canal de calcio voltaje-dependiente  $Ca_v2.2$ . Así, comprobamos que a partir de los 30 minutos de

incubación de la toxina con las células, el valor de la  $IC_{50}$  se mantenía estable en valores inferiores a 30nM (Figura 75).

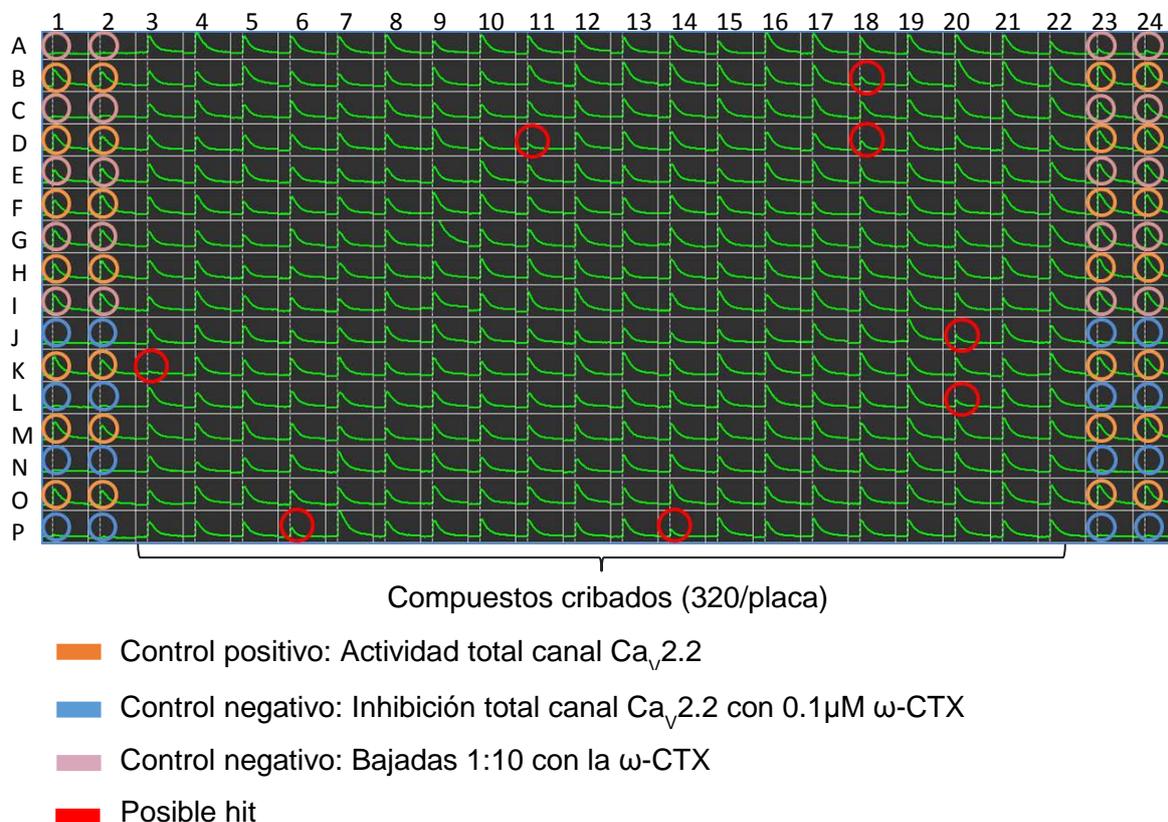


**Figura 75. Variación de la  $IC_{50}$  de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA utilizando diferentes tiempos de incubación.** Se observa la variación de la fluorescencia al aplicar concentraciones crecientes de  $\omega$ -conotoxina-GVIA durante diferentes tiempos de incubación con respecto a la fluorescencia promedio de los controles positivos. A partir de los 30min de incubación de la toxina el valor de la  $IC_{50}$  se estabiliza entorno a ~30nM.

Además, comparando la variación de la  $IC_{50}$  durante el desarrollo de la campaña de HTS con los valores obtenidos anteriormente durante la puesta a punto del ensayo, comprobamos que el valor de la  $IC_{50}$  durante un día de la campaña (con un promedio de 12 placas analizadas en las que se cribaron ~3840 compuestos) fue de ~17nM, muy similar a los valores mostrados anteriormente. Por tanto, la utilización del ensayo fluorimétrico de movilización de calcio nos permitió obtener medidas funcionales aproximadas de parámetros farmacológicos ( $IC_{50}$ ) y seleccionar candidatos de la quimioteca de Laboratorios Esteve que actuaran inhibiendo el canal de calcio  $Ca_v2.2$ .



calidad del ensayo, que midieron el grado de diferenciación entre los controles positivos y negativos en cada placa, adoptamos el valor del ratio S/B así como el valor del factor Z', para evaluar la calidad de los datos obtenidos durante el desarrollo de la campaña de cribado de alto rendimiento.



**Figura 78. Disposición de los compuestos en la placa de cribado.** Ejemplo de respuestas de movilización de calcio en respuesta a la despolarización con una alta concentración de KCl, medidas con el lector de fluorescencia FDSS/  $\mu$ CELL (Hamamatsu). En un ensayo prototípico de HTS, la distinción clara entre los controles positivos y negativos es fundamental y es un índice de la calidad del ensayo. Cada compuesto se prueba en el primer cribado en un único pocillo.

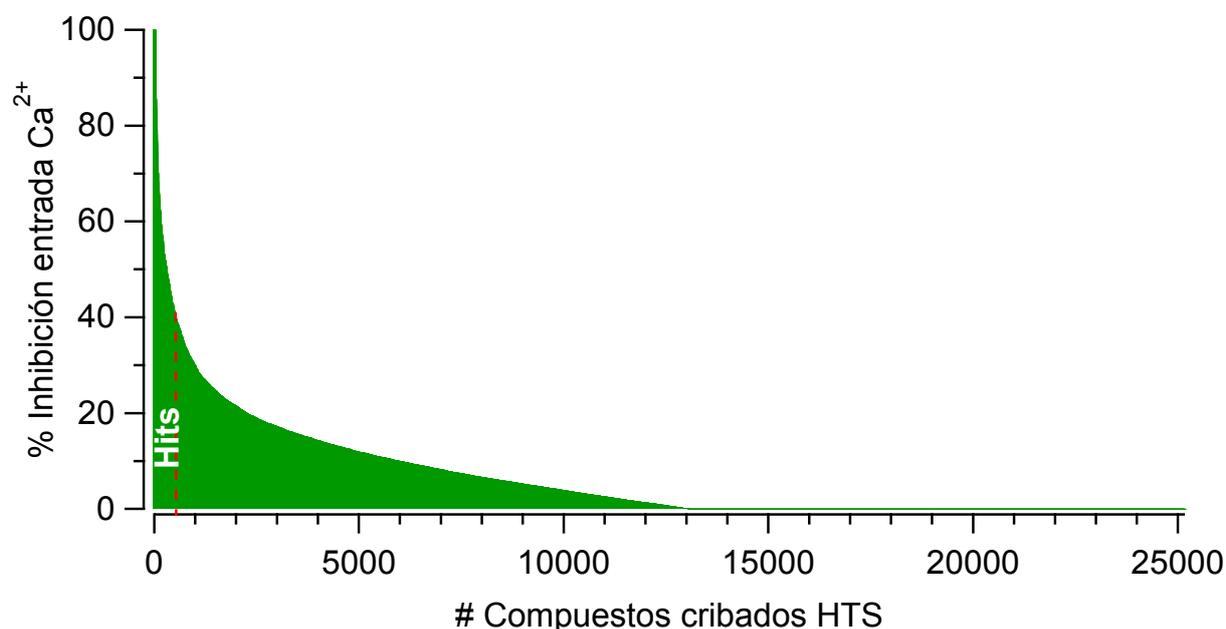
### 5.1 Identificación de hits con potencial interés farmacológico.

Una vez optimizado el ensayo de HTS, procedimos a realizar la campaña de cribado de alto rendimiento sobre la diana seleccionada. Durante el desarrollo de la campaña, analizamos miles de compuestos de la quimioteca de Laboratorios Esteve con el fin de identificar agentes farmacológicos activos que actuaran inhibiendo la entrada de calcio sobre el canal  $Ca_v2.2$ , compuestos que denominamos *hits*. La campaña se desarrolló en varias fases, comenzando por un cribado inicial que permitió la preselección de posibles hits, que se confirmaron en una segunda fase de cribado. Finalmente, después de la selección de *hits* se realizarán estudios de

actividad de cada *hit* seleccionado a partir de la quimioteca, tanto mediante el ensayo de fluorimetría como de electrofisiología automatizada usando el sistema Qpatch (Sophion).

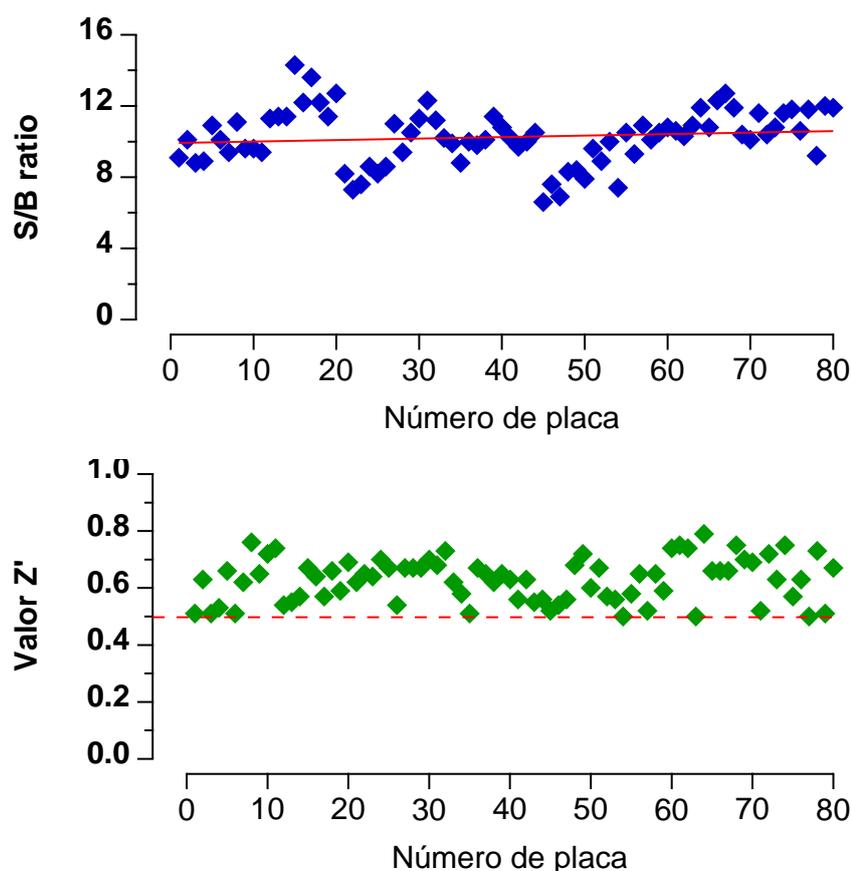
### 1ª Fase de la campaña: selección de *hits*.

Durante la presente campaña de cribado de alto rendimiento, se analizaron un total de 25175 compuestos con el fin de encontrar agentes farmacológicos activos que actuasen inhibiendo la entrada de calcio sobre el canal  $Ca_v2.2$ . En el primer cribado, la acción de cada compuesto se probó en un único pocillo. Los compuestos se repartieron en 80 placas y aquellos compuestos que causaron una inhibición mayor al 41% (promedio global en la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  obtenida por todos los compuestos + 3 veces su desviación estándar) sobre la entrada de calcio por el canal  $Ca_v2.2$  fueron considerados como posibles *hits* o candidatos (Figura 79). Del total de los compuestos cribados en la primera fase del HTS, aproximadamente un 2% de los compuestos analizados fueron preseleccionados para confirmar su acción en un segundo cribado (480 compuestos).



**Figura 79. Selección de *hits*.** Se muestra la inhibición en la entrada de calcio causada por los diferentes compuestos cribados sobre el canal  $Ca_v2.2$  en la primera fase del cribado de alto rendimiento. En el primer cribado cada compuesto se prueba en un único pocillo. Los compuestos de la quimioteca de Laboratorios Esteve que causaron una inhibición superior al 41% en la entrada de calcio se seleccionan como *hits* o posibles candidatos y se analizaron en un segundo cribado. El nivel de corte para la selección de los posibles *hits* que se validan en una segunda fase (inhibición >41% en la entrada de calcio) se establece a partir del promedio global en la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  obtenida por todos los compuestos + 3 veces su desviación estándar.

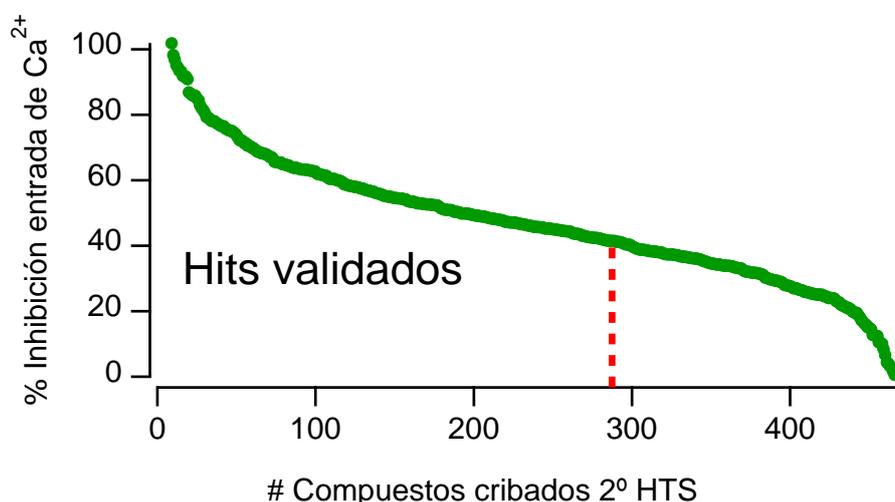
Durante el desarrollo de toda la campaña de HTS, en cada placa se analizaron los valores del ratio S/B y del factor Z' como medidas de evaluación de la calidad del ensayo. La Figura 80 muestra los valores individuales de los parámetros analizados para cada placa individual de compuestos. El valor del factor Z' fue siempre mayor a 0.5 en cada placa de compuestos analizada para poder ser validada. De forma global, el promedio del valor del factor Z' ascendió hasta 0.63 en el ensayo; valor muy superior al mínimo requerido de 0.5, validando así la calidad global del cribado de alto rendimiento llevado a cabo.



**Figura 80. Validación de la calidad del ensayo de fluorimetría.** La calidad del ensayo de movilización de calcio viene determinada por la evaluación del ratio S/B y el valor del factor Z'. En un ensayo típico de HTS, una distinción clara entre los controles positivos y negativos (referida como el ratio S/B) es un índice de la calidad del ensayo ( $S/B=10.3\pm 0.2$ ). El valor global del factor  $Z'>0.6$  ( $0.63\pm 0.01$ ) indica la calidad del ensayo.

## 2ª Fase de la campaña: Confirmación de *hits*.

En la siguiente fase de la campaña, la acción de cada *hit* o posible candidato fue analizada en un segundo cribado. En esta segunda fase, la acción de cada uno de los 480 compuestos preseleccionados se probó en placas donde cada compuesto estaba representado en dos pocillos. Los compuestos que causaron de nuevo una inhibición mayor al 41% sobre la entrada de calcio, fueron seleccionados definitivamente como *hits*. La tasa de confirmación de los compuestos seleccionados que procedían directamente de la quimioteca fue de un 60% (Tabla 18), confirmando que 290 compuestos sobre los 480 seleccionados ejercieron una inhibición en la entrada de calcio superior al 41%, límite que establecimos como nivel de corte en el ensayo.



Nº compuestos seleccionados 2X	480
Nivel de corte para la selección de posibles <i>Hit</i>	Inhibición >41% entrada $\text{Ca}^{2+}$
Confirmación obtenida <i>Hits</i>	290
Tasa confirmación de <i>Hits</i>	60%

**Tabla 18. Confirmación de los posibles *hits*.** En la segunda fase del cribado de alto rendimiento se analiza la acción de cada posible *hit* por duplicado. En el ensayo fluorimétrico de movilización de calcio se confirmaron >60% de los *hits* preseleccionados, estableciendo un nivel de corte en la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  >41% para la selección de los *hits*.

Por último, y para finalizar el cribado de alto rendimiento, se llevarán a cabo estudios de actividad de cada *hit* seleccionado a partir de la quimioteca, tanto mediante ensayos de fluorimetría como de electrofisiología automatizada a través del sistema Qpatch (Sophion), utilizando curvas concentración-respuesta para determinar la potencia de cada uno de los *hits* sobre el canal de calcio tipo N.

# DISCUSIÓN



Los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N (Cav2.2) representan una diana altamente atractiva para las compañías farmacéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos. Debido a los papeles esenciales que desempeñan estos canales en la función y comunicación neuronal (Südhof, 2012), y a que se encuentran distribuidos en las neuronas responsables de la percepción del dolor desde los terminales aferentes hasta las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Bourinet et al., 2014), representan una diana interesante para la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos que alivien el dolor. En concreto, la eficacia demostrada del fármaco ziconotide (Prialt®, Elan Pharmaceuticals) en el tratamiento de varios tipos de dolor, ha aumentado el interés de la industria farmacéutica por el desarrollo de ensayos de cribado de alto rendimiento que permitan la búsqueda de nuevas moléculas que actúen de forma selectiva sobre el canal Cav2.2 (Vortherms et al., 2011). El ziconotide es un péptido de 25aa que actúa bloqueando el poro del canal de calcio voltaje-dependiente de tipo N con alta especificidad y afinidad. No obstante, presenta aspectos negativos como la vía de administración (intratecal), severos efectos secundarios y además se une al canal de forma estado-independiente. Por ello, en la actualidad el desarrollo de ensayos de HTS se enfoca en la búsqueda de pequeñas moléculas que puedan ser administradas por vía oral, que presenten perfiles de seguridad mejorados y que actúen de forma estado-dependiente, uniéndose más firmemente a estados activados del canal (Yekkirala et al., 2017).

Con el objetivo de identificar nuevos compuestos que actúen inhibiendo la entrada de calcio a través del canal Cav2.2 y que tengan un potencial farmacológico, en la presente tesis optimizamos un método fluorimétrico de movilización de calcio que ha permitido la selección de posibles candidatos o *hits* de la quimioteca de Laboratorios Esteve. Concretamente, después de realizar las dos primeras fases del ensayo de HTS confirmamos 290 *hits* (Tabla 18) que ejercieron una inhibición >41% en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal Cav2.2, sobre un total de 25175 compuestos analizados (Figura 79). Entre los compuestos confirmados con potencial interés farmacológico, se llevarán a cabo estudios para determinar la potencia de cada *hit* seleccionado, enfocando la búsqueda hacia inhibidores estado-dependientes que se unan más firmemente a estados activados del canal y que

actúen inhibiendo preferentemente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en aquellas neuronas que se encuentran sensibilizadas, que causan dolor neuropático.

Por otra parte, dos de los fármacos más prescritos contra el dolor neuropático, la pregabalina y la gabapentina, ejercen preferentemente su acción sobre las neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del asta dorsal de la médula espinal asociadas a fibras de tipo C y A $\delta$  (Biggs et al., 2014), uniéndose con gran afinidad a la subunidad auxiliar  $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de calcio de tipo N (Li et al., 2011). Sin embargo, a pesar de ser fármacos *best-sellers* que se utilizan como tratamientos de primera línea contra el dolor neuropático (Finnerup et al., 2015), su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Además, se ha descrito que su uso reporta alivio del dolor únicamente en un tercio de los pacientes tratados (Derry et al., 2019). Por todo ello, entender mejor el mecanismo de acción de los gabapentinoides a nivel sináptico y cuáles son las implicaciones funcionales que produce la unión de los gabapentinoides con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, así como investigar posibles mecanismos endógenos que compitan con la acción de los gabapentinoides, es necesario para explicar sus acción.

Los resultados generados a lo largo de esta tesis ayudan a obtener una imagen más nítida sobre la capacidad de la pregabalina para modificar la neurotransmisión de forma aguda. Estudiando la población homogénea de sinapsis presentes en los SCMs, demostramos que la interacción de la pregabalina y del ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, inhibe de forma aguda la liberación sincrónica de vesículas sinápticas controlada por los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N. Visualizando de manera simultánea la entrada de calcio presináptico mientras registramos las respuestas postsinápticas, comprobamos que el efecto de la pregabalina y la neurexina-1 $\alpha$  no está relacionado con una reducción significativa en la entrada de calcio presináptico. Por el contrario, el efecto reside en una alteración de la organización física establecida entre los canales de calcio y las vesículas sinápticas de la zona activa, reduciéndose de manera notable el tamaño efectivo del depósito de vesículas de liberación rápida. Asimismo, comprobamos que la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 potencia los efectos observados con la pregabalina y la neurexina-1 $\alpha$  en la neurotransmisión; efectos que son mutuamente exclusivos.

La principal función de las subunidades  $\alpha 2\delta$  expresadas en el terminal presináptico es incrementar la eficiencia entre la entrada de calcio presináptico y la liberación de vesículas sinápticas (Hoppa et al., 2012). Hoppa y colaboradores demostraron que la expresión de las subunidades  $\alpha 2\delta$  produce un aumento de la exocitosis en las sinapsis centrales de hipocampo y que el efecto no está relacionado con un aumento de la conductancia del canal, sino que es debido a su papel como organizadores de las zonas activas, función conservada entre las isoformas  $\alpha 2\delta$ -1,  $\alpha 2\delta$ -2 y  $\alpha 2\delta$ -3. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que una vez que las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 se insertan en las zonas activas, establecen plataformas de señalización con el interior celular capaces de regular la liberación del RRP a través de señales extracelulares. La subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 requiere la unión de L-leucina, L-isoleucina o L-metionina para mantener su función estructural (Thurlow et al., 1993). Sin embargo, el desplazamiento de estos aminoácidos endógenos por los gabapentinoides altera el funcionamiento normal de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 causando un descenso en la eficiencia de la liberación sincrónica de neurotransmisores (Figuras 44, 52).

### **1. La unión de la pregabalina a la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 reduce la neurotransmisión sincrónica acoplada a los canales de calcio presinápticos de tipo N.**

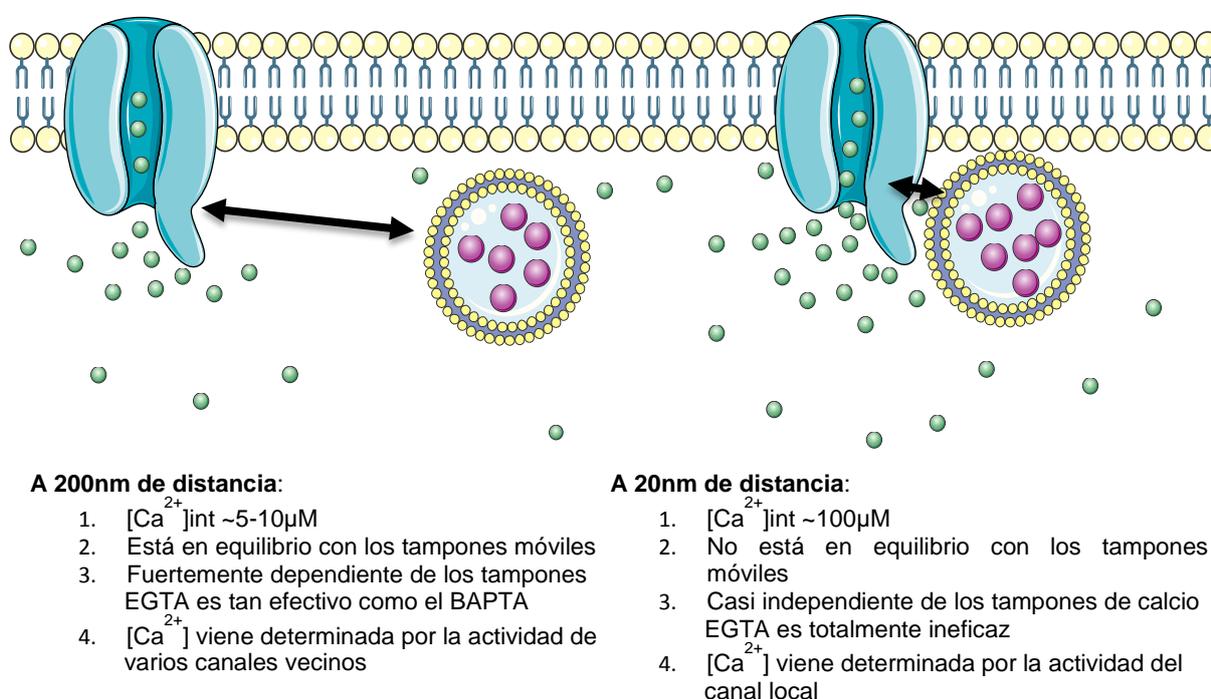
Generalmente se ha aceptado que la acción de la pregabalina o gabapentina está causada por su interacción intracelular con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 y 2 impidiendo el tráfico de los canales de calcio dependientes de voltaje (Zamponi et al., 2015). No obstante, usando una sinapsis prototípica de tipo N con unas condiciones experimentales diseñadas para investigar efectos agudos, hemos visto que la pregabalina no afecta al tráfico (Figura 58) sino a las funciones sinápticas de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1. La causa es una disminución del tamaño efectivo del RRP (Figuras 51 y 52). Mediante la disociación de la actividad de los componentes pre- y postsinápticos en los SCMs comprobamos que la disminución en la liberación del RRP en presencia de la pregabalina no se debe a una reducción en la entrada de calcio presináptico (Figura 50). La principal causa es la alteración del acoplamiento funcional que existe entre los canales de calcio de tipo N y las vesículas sinápticas de la zona activa que constituyen el RRP. Bloqueando de forma gradual los canales de calcio de tipo N al aplicar concentraciones crecientes de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA, comprobamos que la relación que existe entre la entrada de calcio por los canales

de tipo N y la liberación del RRP sigue una función exponencial simple (Figura 52). Este hecho implica que pequeños cambios en la entrada de calcio en el terminal, puede producir efectos drásticos en la liberación de las vesículas ancladas a la zona activa, tal y como comprobamos al ir bloqueando gradualmente los canales de calcio de tipo N. Sin embargo, el efecto que produce la pregabalina sobre la neurotransmisión se aleja de la relación mencionada: en términos de entrada de calcio presináptico la pregabalina modifica ligeramente el flujo de entrada de calcio, reduciéndolo aproximadamente en torno a un ~25% (Figura 52). Esta acción es similar al bloqueo ejercido por la  $\omega$ -conotoxina-GVIA a una concentración de 0.3 $\mu$ M. Sin embargo, la presencia de la pregabalina disminuye el tamaño del RRP en un 60%, hasta valores similares a los que se observan cuando los canales de tipo N están prácticamente bloqueados (Figura 52). Por tanto, el análisis binario entre la liberación del RRP y el incremento de calcio global que ocurre a nivel presináptico durante la estimulación, indica que el efecto de la pregabalina sobre la neurotransmisión es esencialmente calcio independiente.

La posible contribución postsináptica en los efectos observados en agudo con la pregabalina se descartó aplicando localmente un pulso químico con una gota de acetilcolina a los SCMs. Llevando a cabo esta aproximación, activamos únicamente los receptores nicotínicos de los SCMs y en consecuencia generamos respuestas postsinápticas puras, que no variaron en presencia del fármaco (Figura 53). Por tanto, comprobamos que el efecto de la pregabalina es mediado a través de un mecanismo exclusivamente presináptico y que no está relacionado con la interacción de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 con los receptores nicotínicos postsinápticos.

Uno de los mecanismos intracelulares que regulan la liberación del RRP son los tampones móviles intracelulares de calcio (Burrone et al., 2002). Éstos regulan la eficiencia del flujo de entrada de calcio presináptico desencadenando la liberación rápida de neurotransmisores. En los SCMs sustituimos a los tampones de calcio endógenos mediante la adición en el medio intracelular de agentes quelantes de calcio exógenos como el EGTA (Lopez-Murcia et al., 2014). De esta forma, podemos inferir la relación espacial que se da entre los canales de calcio y las vesículas sinápticas (Neher, 1998). En los SCMs, observamos que un incremento de 10 veces en la concentración intracelular de EGTA produce un descenso en la liberación de las vesículas del RRP, como consecuencia de la reducción en la expansión de los

microdominios de calcio (Beaumont et al., 2005). En el caso de la pregabalina, su acción reduciendo el tamaño del RRP es independiente de la concentración intracelular del EGTA, al no acentuarse la caída del valor del RRP en presencia de una concentración mayor del agente quelante (Figura 54). La adición de elevadas concentraciones de tampones extracelulares como el EGTA en la solución interna de registro, es un método particularmente efectivo desacoplando la liberación de las vesículas que están lejos de los canales de calcio (Neher, 1998). Por tanto, las vesículas no afectadas por la pregabalina o por un incremento de 10 veces en la concentración del EGTA son aquellas que probablemente están más próximas a los canales de calcio dependientes de voltaje en las zonas activas (Figura 81).



**Figura 81. La importancia de la localización.** En las zonas activas de un terminal presináptico los sitios de liberación de las vesículas sinápticas y los canales de calcio dependientes de voltaje están agrupados. Se contrastan dos situaciones: En la primera hay una distancia entre el canal de calcio dependiente de voltaje y la vesícula sináptica  $\sim 200nm$  y en la segunda hay una separación de  $\sim 10-20nm$ . La primera situación representa una distancia promedio entre canales de calcio mezclados aleatoriamente con los sitios de liberación; mientras que la segunda situación es característica cuando el canal de calcio forma parte de la maquinaria de liberación. Modificado a partir de: Neher, 1998.

Debido a que una fracción de las subunidades  $\alpha 2\delta-1$  tiene una localización intracelular, estudiamos también la posible contribución de la fracción citoplasmática en los efectos descritos, aumentando el tiempo de incubación de la pregabalina (Figura 57). Comprobamos que los efectos de la pregabalina modificando la neurotransmisión se deben a su interacción con las subunidades  $\alpha 2\delta-1$  sinápticas

(Figura 58). En los SCMs las acciones agudas de los gabapentinoides pueden estar favorecidas por una mayor accesibilidad de los contactos sinápticos en comparación con otras sinapsis del SNC. La falta de la glía envolvente podría facilitar el lavado de los aminoácidos que actúan como ligandos endógenos de las subunidades  $\alpha 2\delta$  o permitir un acceso mejorado a través de la densa red de proteínas presentes en la hendidura sináptica (Perez de Arce et al., 2015).

## **2. Los gabapentinoides y la neurexina-1 $\alpha$ se unen a la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 para regular el acoplamiento de los canales de calcio de tipo N con la neurotransmisión sincrónica.**

Para comprender mejor la regulación aguda ejercida por los gabapentinoides sobre la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, investigamos el papel de la NRX1 $\alpha$  sobre la neurotransmisión en los microcultivos. Así, comprobamos que la región extracelular recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  compite por la unión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 con la pregabalina (Figura 59) para regular la liberación sincrónica de las vesículas sinápticas del RRP. Las  $\alpha$ -neurexinas son proteínas esenciales en la exocitosis  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de neurotransmisores (Missler et al., 2003). En *C. elegans* se ha demostrado que la regulación de la neurotransmisión se produce a través de la unión de las  $\alpha$ -neurexinas, a través de sus dominios extracelulares LG1 y LG5, a las subunidades  $\alpha 2\delta$ -3 (Tong et al., 2017). Tong y colaboradores demostraron también que la NRX1 $\alpha$  se une a las principales subunidades de  $\alpha 2\delta$ , mostrando mayor afinidad por  $\alpha 2\delta$ -3. Esta interacción se vuelve funcional una vez que la NRX1 $\alpha$  es procesada proteolíticamente por las metaloproteasas o ADAMS, que liberan el dominio extracelular de la proteína, produciendo como resultado la inhibición de la transmisión sináptica (Tong et al., 2017). Además, recientemente se ha propuesto que la interacción de las  $\alpha$ -neurexinas con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 es un mecanismo que regula la entrada de calcio a través de los canales de tipo P/Q en sinapsis centrales (Brockhaus et al., 2018).

En los microcultivos neuronales establecidos a partir del ganglio superior cervical, comprobamos que la región extracelular recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  (Leu31-Thr1431) ejerce acciones similares a las de la pregabalina, modificando el tamaño del RRP sin disminuir el flujo de entrada de calcio presináptico. De manera diferencial a la pregabalina, observamos un mínimo efecto sobre la neurotransmisión en agudo cuando los SCMs expresan niveles basales de  $\alpha 2\delta$ -1 (Figura 60). Sin

embargo, aumentando el tiempo de exposición de la NRX1 $\alpha$  a 48h pudimos observar efectos relevantes en la neurotransmisión, al disminuir las corrientes excitatorias postsinápticas en ~50% (Figura 61) y reducir el tamaño funcional del RRP ~60%, sin alterarse la entrada de calcio presináptico (Fig. 62 y 63). Además, comprobamos que los efectos de la neurexina-1 $\alpha$  y de la pregabalina son mutuamente excluyentes, ya que ambos compuestos compiten por el mismo sitio de unión en la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 (Figura 59) y por tanto, la presencia de los dos compuestos no produce una mayor reducción en el valor del RRP (Figura 63). Consideramos que la NRX1 $\alpha$  ejerce su acción de forma más relevante sobre las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 localizadas en las sinapsis debido a que el gran tamaño del péptido (1400aa:Leu31-Thr1431) limitaría su internalización, impidiendo así que se puedan alcanzar concentraciones relevantes en el interior celular que puedan explicar su acción. Por el contrario, al tratarse de un péptido de gran tamaño, creemos que su accesibilidad para interactuar con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 en la densa red de proteínas presentes en las sinapsis es limitada. Además, la interacción de  $\alpha 2\delta$ -1 con los canales de calcio en las zonas activas oculta algunos de sus epítomos (Cassidy et al., 2014) y por ello, podría necesitar más tiempo para poder ejercer su acción.

A modo de resumen, las observaciones mencionadas sugieren que la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 actúa como una plataforma molecular regulando la neurotransmisión acoplada a los canales tipo N, actuando como un sensor extracelular de ligandos endógenos y exógenos cuya unión (ej. pregabalina o neurexina) produce un desacoplamiento de la liberación sincrónica de neurotransmisores acoplados a los canales de calcio voltaje-dependientes del tipo N (Figura 82). Nuestros resultados están a favor de que las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 expresadas en los SCMs están acopladas a los canales de calcio de tipo N (Figura 49), de forma similar a la asociación de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -2 con los canales de tipo L en las células ciliadas internas (Fell et al., 2016). En esta tesis desvelamos la implicación de la región extracelular de la NRX1 $\alpha$  en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Figura 83). Aunque no hemos establecido el mecanismo proteolítico que causa la liberación del ectodominio de la NRX1 $\alpha$ , podemos especular con posibles vías implicadas. Las condiciones inflamatorias relacionadas con el dolor neuropático podrían estimular la secreción de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) o ADAMs por parte de las células gliales (Old et al.,

2015), capaces de cortar muchas proteínas sinápticas de adhesión (Bajor & Kaczmarek, 2013). Además, teniendo en cuenta que la interacción con  $\alpha 2\delta$ -1 es mutuamente excluyentes con pregabalina, el incremento de la presencia de la región extracelular de la NRX1 $\alpha$  durante condiciones inflamatorias podría contribuir a la variabilidad descrita de los gabapentinoides (Moore et al., 2011).

### **3. La sobreexpresión de $\alpha 2\delta$ -1 potencia los efectos de la pregabalina y la neurexina-1 $\alpha$**

Debido a que los SCMs también expresan las subunidades  $\alpha 2\delta$ -2 y 3 (Figura 40), evaluamos si las acciones ejercidas tanto por la pregabalina como por la NRX1 $\alpha$  estaban mediadas de forma exclusiva por la coordinación de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 con los canales de calcio de tipo N. Los gabapentinoides se unen con gran afinidad a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1, pero también se unen a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -2 (Li et al., 2011). La NRX1 $\alpha$  tiene una gran afinidad por  $\alpha 2\delta$ -3, se une a  $\alpha 2\delta$ -2 (Tong et al., 2017) y compite con la gabapentina por su unión a  $\alpha 2\delta$ -1 (Figura 59). Por ello, para descartar la implicación de las isoformas  $\alpha 2\delta$ -2 y 3 en los efectos observados, modificamos genéticamente los SCMs sobreexpresando la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 utilizando dos sistemas de sobreexpresión diferentes (Figura 65).

En modelos animales de dolor neuropático se ha demostrado que existe un aumento en la expresión de la proteína  $\alpha 2\delta$ -1 tras producirse una lesión nerviosa (Luo et al., 2001; Xiao et al., 2002; Boroujerdi et al., 2008; Bauer et al., 2009) como consecuencia de la actividad alterada de los nociceptores (Boroujerdi et al., 2008). El resultado que produce el cambio molecular es un incremento en la liberación de neurotransmisores en las neuronas nociceptivas de la médula espinal (Zhou & Luo, 2014) que contribuyen a la sensibilización de los nociceptores (Zhou & Luo, 2015) y en consecuencia, al establecimiento del dolor neuropático. Además, también se ha observado que los animales modificados genéticamente que sobreexpresan  $\alpha 2\delta$ -1 desarrollan alodinia mecánica de forma natural (Li et al., 2006).

Se hipotetiza que mecanismo de acción de los gabapentinoides está asociado a una reducción en la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, las observaciones obtenidas sobre su acción de forma aguda en este sentido son contradictorias. Biggs y colaboradores mostraron que la pregabalina sí bloquea la transmisión sináptica en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal y que la

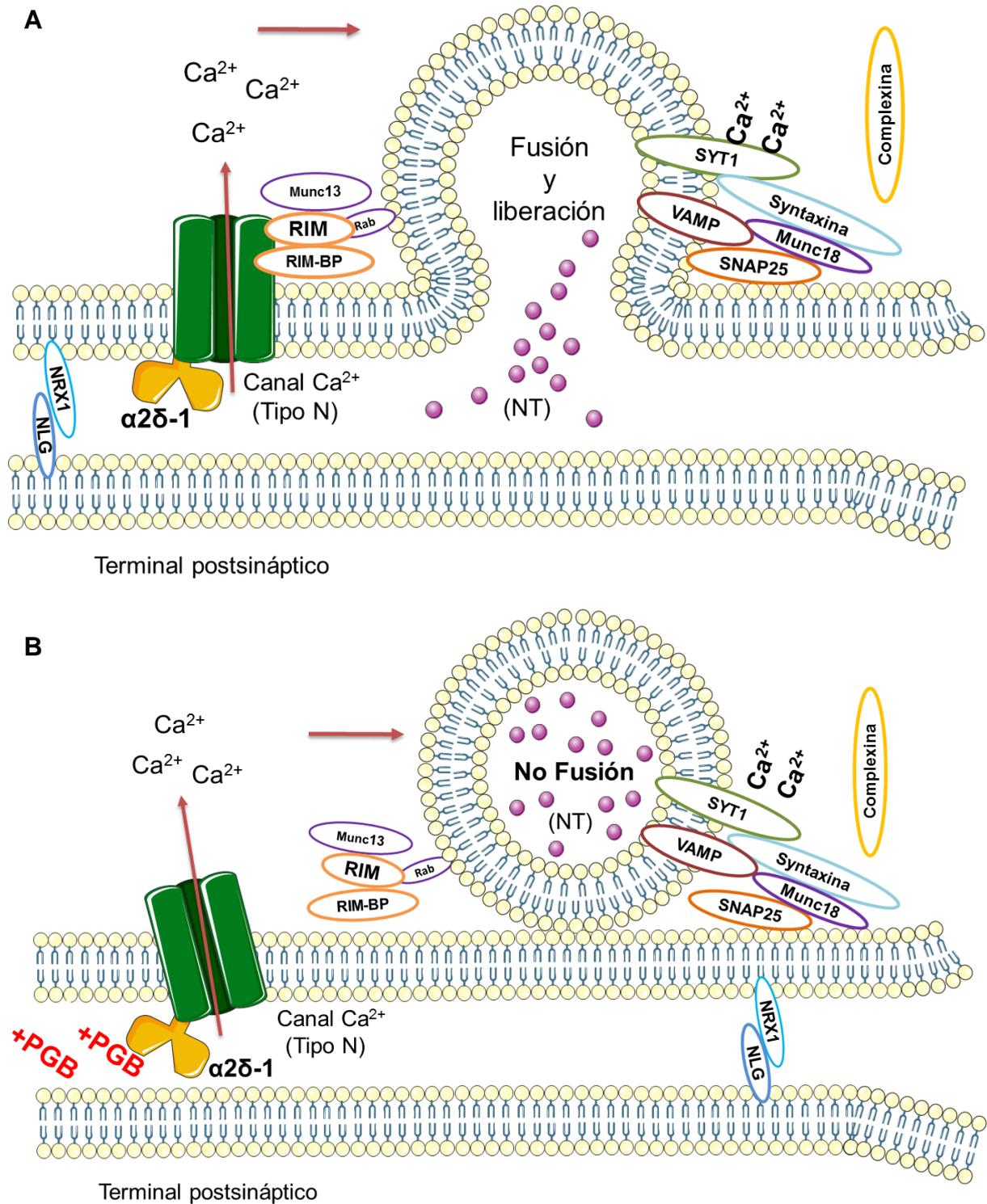
reducción en la liberación de neurotransmisores en presencia de la pregabalina no se debía a una alteración del canal de calcio (Biggs et al., 2014). Sin embargo, en otros estudios tanto la gabapentina como la pregabalina parecen ser inefectivas (Hendrich et al., 2008; Hendrich et al., 2012). Por otra parte, en un modelo animal de dolor neuropático que desarrolla alodinia mecánica, el tratamiento agudo con la gabapentina sí restaura la transmisión sináptica hasta niveles previos a la lesión (Alles et al., 2017). Por lo tanto, como consecuencia de la aplicación en agudo de los gabapentinoides se hipotetiza que se produce un descenso en la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal (Biggs et al., 2014; Alles et al., 2017).

Modificando genéticamente los SCMs conseguimos desarrollar un modelo *in vitro* de “neurona neuropática”. Utilizando dos sistemas de sobreexpresión diferentes comprobamos que la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 produce un aumento en la cantidad de proteína  $\alpha 2\delta$ -1 en los microcultivos, aunque ésta fue variable (Figura 67). Debido a que la expresión de las subunidades  $\alpha 2\delta$  establece la probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas en sinapsis centrales (Hoppa et al., 2012), esperábamos poder asociar el cambio morfológico con un algún cambio funcional en los SCMs. Comprobamos que la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 se traduce en un aumento del tamaño funcional del RRP en los SCMs y además observamos que la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$ -1 genera EPSCs de mayor tamaño (Figura 68). A continuación, comparando las acciones que ejercen la pregabalina y la NRX1 $\alpha$  en las neuronas que expresan niveles basales de  $\alpha 2\delta$ -1 (Figura 69) y en las que sobreexpresan de forma específica la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 (Figuras 70 y 72), confirmamos que las acciones ejercidas por la pregabalina y la NRX1 $\alpha$  sobre la neurotransmisión están mediadas por su unión a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1.

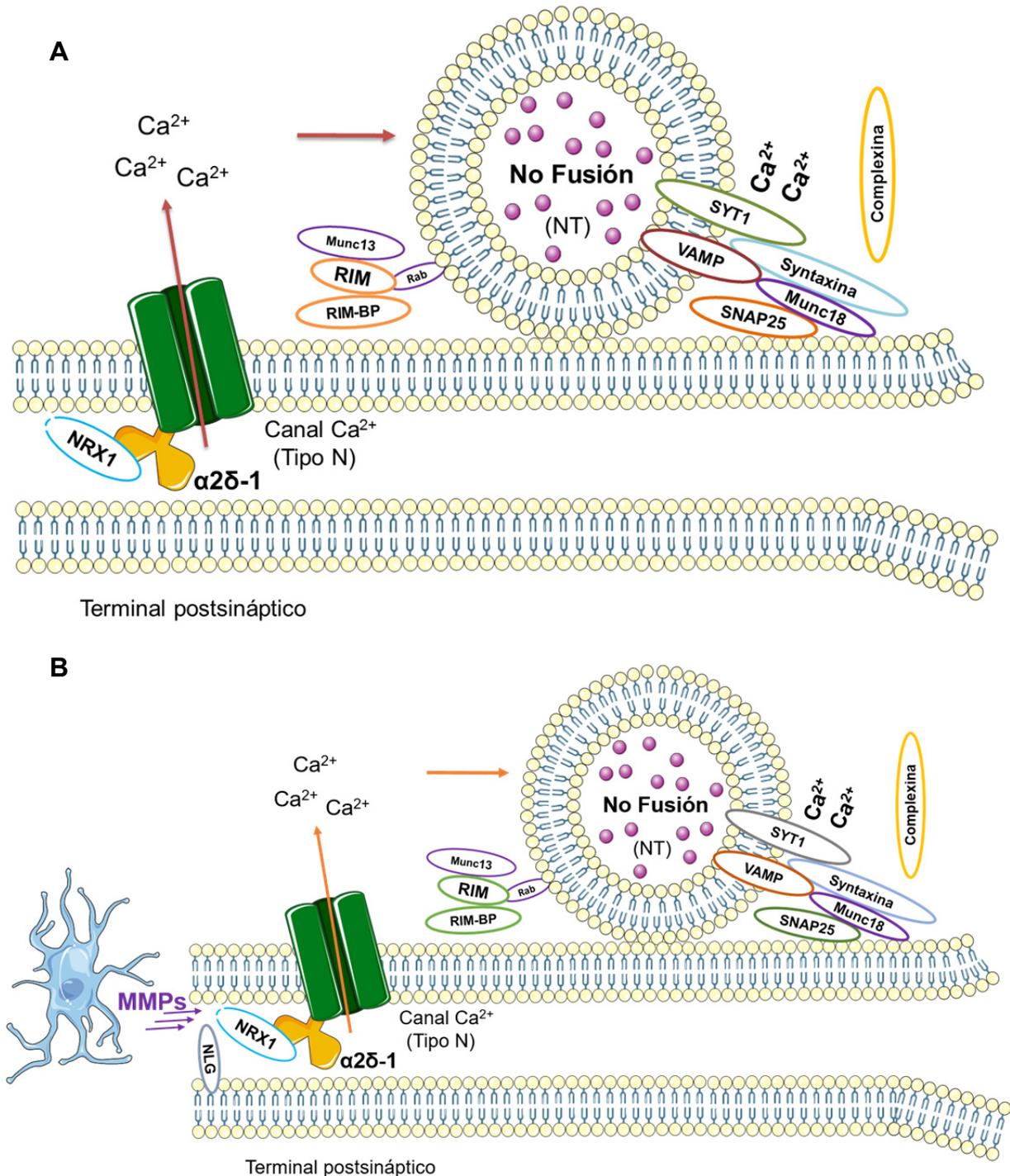
En el caso de la pregabalina, observamos que su acción se vuelve más sensible a la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta$ -1, al obtener una inhibición mayor en las corrientes excitatorias postsinápticas de aquellas neuronas que inicialmente presentan EPSCs más grandes, utilizando concentraciones menores del fármaco (Figura 70). Por otra parte, la acción del ectodominio recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  se vuelve sensible a la sobreexpresión de la subunidad en agudo (Figura 72), debido probablemente a una mayor accesibilidad de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 al péptido recombinante.

Debido a su privilegiada localización extracelular en las zonas activas, las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 emergen como una diana sináptica común desde donde fármacos como los gabapentinoides o moléculas endógenas como el ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$  pueden controlar la neurotransmisión sincrónica (Figuras 82 y 83). Aunque nuestros experimentos no revelan la vía de transducción asociando el RRP con las subunidades  $\alpha 2\delta$ , un posible candidato podría ser la proteína RIM. Las proteínas RIM están en contacto con los canales de calcio dependientes de voltaje en las zonas activas (Kaesler et al., 2012) y están implicadas en la liberación sincrónica de neurotransmisores afectando al anclaje y preparación de las vesículas sinápticas en la zona activa (Kaesler et al., 2011). Además, se ha descrito que una putativa interacción de  $\alpha 2\delta$ -3 con RIM podría ser determinante para la homeostasis de las zonas activas (Wang et al., 2016). Nuestros resultados apuntan a evaluar la posibilidad de que  $\alpha 2\delta$ -1 es capaz de señalar al RRP a través de RIM. La participación de otras familias similares de proteínas como las RIM-BPs (Südhof, 2012) o la contribución directa de los canales de calcio dependientes de voltaje (Chen et al., 2017) también debería considerarse.

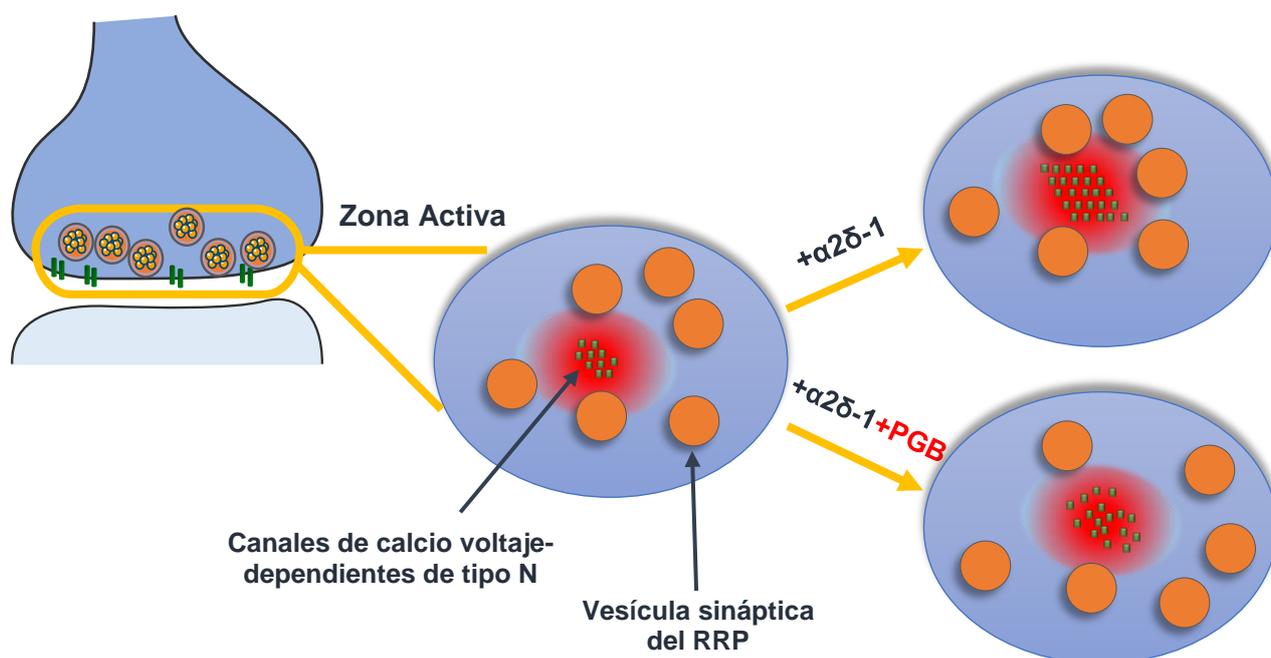
Por último, y en base a los resultados obtenidos durante la tesis, cabría remarcar que sería muy interesante desarrollar en el futuro algún ensayo de HTS que permitiera obtener una medida directa de la liberación de neurotransmisores en cultivos masivos neuronales. Debido a que los gabapentinoides regulan de forma aguda la neurotransmisión sincrónica sin alterar la entrada de calcio presináptico (Figuras 50 y 51) a través de las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 sinápticas (Figura 58), éstas emergen como una potencial diana a explorar por las compañías farmacéuticas. En este sentido, el desarrollo de nuevos ensayos de HTS que permitan identificar potenciales fármacos análogos a los gabapentinoides sería una posible estrategia a valorar por las compañías farmacéuticas, en la búsqueda de nuevos fármacos que actúen contra el dolor neuropático.



**Figura 82. Los gabapentinoides alteran la organización física establecida entre los canales de calcio de tipo N y las vesículas sinápticas de la zona activa. A)** En los SCMs las subunidades  $\alpha 2\delta - 1$  funcionan como una plataforma molecular que regula el acoplamiento entre la entrada de Ca<sup>2+</sup> presináptico por los canales de calcio de tipo N y la liberación de las vesículas sinápticas ancladas a la zona activa. **B)** La interacción de la pregabalina con la subunidad  $\alpha 2\delta - 1$  inhibe la liberación sincrónica de las vesículas sinápticas en los SCMs de forma aguda. El efecto no está relacionado con una reducción en la entrada de Ca<sup>2+</sup> presináptico. Por el contrario, el efecto reside en una alteración de la organización física establecida en las zonas activas entre los canales de calcio de tipo N y las vesículas sinápticas del depósito de liberación rápida.



**Figura 83. Implicación de la región extracelular de la neurexina-1 $\alpha$  en la regulación de la neurotransmisión. A)** La región extracelular de la neurexina-1 $\alpha$  (Leu31-Thr1431) regula la liberación sincrónica de neurotransmisores en los SCMs. Su interacción con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 afecta a la liberación de las vesículas sinápticas ancladas a la zona activa, sin modificar la entrada de calcio presináptico. Los efectos de la NRX1 $\alpha$  son similares a los ejercidos por la pregabalina pero, al competir las dos moléculas por la unión a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en el mismo sitio de unión, sus acciones son mutuamente excluyentes. **B)** En condiciones de dolor neuropático, las células gliales podrían estimular la secreción de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs), capaces de cortar proteínas sinápticas de adhesión como la neurexina-1 $\alpha$  e inhibir la liberación de neurotransmisores a través de la interacción de la región extracelular de la NRX1 $\alpha$  con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1.



**Figura 84. Mecanismo propuesto de la regulación de la neurotransmisión por  $\alpha 2\delta - 1$ .** **A)** En los SCMs, las subunidades  $\alpha 2\delta - 1$  acopladas a los canales de calcio de tipo N localizados en las zonas activas, actúan como sensores capaces de reconocer ligandos exógenos y endógenos cuya principal función es regular el acoplamiento entre la entrada de calcio por los canales de tipo N con la liberación de las vesículas sinápticas del RRP. **B)** La sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta - 1$  produce cambios funcionales en el acoplamiento de las vesículas del RRP con los canales de calcio de tipo N. Los cambios funcionales generados causan una mayor coordinación entre los canales de calcio de tipo N y las vesículas sinápticas de la zona activa. Como consecuencia se produce un aumento del tamaño funcional del RRP (Fig 68) y se liberan más vesículas del RRP cuando llega un potencial de acción, lo cual genera EPSCs anormalmente grandes, que incrementan su tamaño >40% (Fig 68). Además, debido a la sobreexpresión de  $\alpha 2\delta - 1$  probablemente se inserten más canales de calcio voltaje-dependientes en la zona activa (pasan 5-7 días desde que infectamos los SCMs hasta que registramos su actividad neuronal). **C)** La interacción de ligandos exógenos, como la pregabalina, o endógenos, como el ectodominio recombinante de rata NRX1 $\alpha$ , con la subunidad  $\alpha 2\delta - 1$ , produce una alteración física entre los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N y las vesículas del RRP. Esta alteración física causa un desacoplamiento entre la entrada de calcio presináptico a través de los canales de calcio tipo N y liberación de las vesículas sinápticas del RRP. Como resultado se inhibe la liberación del RRP > 60% (Fig 63).



# **CONCLUSIONES**



1. Los cultivos autópticos de neuronas colinérgicas del ganglio cervical superior de rata suponen un buen modelo para el estudio del mecanismo de acción de los gabapentinoides a nivel sináptico.
2. En las sinapsis colinérgicas *in vitro*, la liberación de neurotransmisores está controlada por la entrada de calcio en el terminal presináptico a través de los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N.
3. El registro simultáneo de la actividad pre- y postsináptica en los microcultivos, utilizando el indicador de calcio presináptico syGCaMP6f, es una herramienta muy útil que permite discriminar el efecto de los gabapentinoides sobre los componentes pre- y postsinápticos de la neurotransmisión.
4. La interacción de la pregabalina con las subunidades  $\alpha 2\delta$ -1 sinápticas produce un descenso en la neurotransmisión de forma aguda.
5. La pregabalina disminuye el tamaño efectivo del RRP en la población homogénea de sinapsis colinérgicas presentes en los cultivos autópticos.
6. El efecto de la pregabalina sobre la neurotransmisión es de origen presináptico y no está relacionado con una reducción de la entrada de calcio presináptico.
7. La pregabalina altera la organización física establecida entre los canales de calcio de tipo N y las vesículas sinápticas de la zona activa.
8. El ectodominio extracelular de la neurexina-1 $\alpha$  se une con gran afinidad a la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1.
9. La interacción de la región extracelular de la neurexina-1 $\alpha$  con la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 inhibe la neurotransmisión de forma similar a la pregabalina, produciendo un descenso en la liberación de las vesículas sinápticas del RRP, sin alterar la entrada de calcio presináptico.

- 10.** Tanto la pregabalina como el ectodominio extracelular recombinante de la neurexina-1 $\alpha$  compiten por el mismo sitio de unión en la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 para regular la liberación sincrónica de las vesículas sinápticas de la zona activa, siendo sus efectos mutuamente excluyentes.
- 11.** La sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ -1 en los SCMs potencia los efectos funcionales de la neurexina y la pregabalina.
- 12.** Las subunidades  $\alpha 2\delta$  son dianas sinápticas desde donde fármacos como los gabapentinoides, o moléculas endógenas como el ectodominio de la neurexina-1 $\alpha$ , pueden controlar de forma aguda la liberación sincrónica de neurotransmisores.
- 13.** La variabilidad en la composición molecular de las sinapsis puede ser clave para explicar la efectividad del tratamiento con los gabapentinoides.
- 14.** El cribado de alto rendimiento de quimiotecas estudiando la inhibición de la entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo N permite identificar compuestos con potencial actividad analgésica.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Niederkofler V, Zimmerman AL, Dymecki SM, et al. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell*. 2016;168:1–16.
- Albrecht D, López-Murcia FJ, Pérez-González AP, Lichtner G, Solsona C, Llobet A. SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Mol Cell Neurosci*. 2012;49(3):364–74.
- Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanism of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011;115(6):1363–81.
- Alles SRA, Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):315–47.
- Alles SRA, Bandet M V., Eppler K, Noh MC, Winship IR, Baker G, et al. Acute anti-allodynic action of gabapentin in dorsal horn and primary somatosensory cortex: Correlation of behavioural and physiological data. *Neuropharmacology*. 2017;113:576–90.
- Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol*. 2006;13 (11):1153–69.
- Augustine GJ. How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(3):320–6.
- Bajor M, Kaczmarek L. Proteolytic remodeling of the synaptic cell adhesion molecules (CAMs) by metzincins in synaptic plasticity. *Neurochem Res*. 2013;38(6):1113–21.
- Balasubramanyan S, Stemkowski PL, Stebbing MJ, Smith PA. Sciatic Chronic Constriction Injury Produces Cell-Type-Specific Changes in the Electrophysiological Properties of Rat Substantia Gelatinosa Neurons. *J Neurophysiol*. 2006;96(2):579–90.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, et al. Ducky Mouse Phenotype of Epilepsy and Ataxia Is Associated with Mutations in the *Cacna2d2* Gene and Decreased Calcium Channel Current in Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci*. 2001;21(16):6095–104.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009;139(2):267–84.
- Basso L, Altier C. Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;32:9–15.
- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, et al. The Increased Trafficking of the Calcium Channel Subunit  $\alpha 2\delta$ -1 to Presynaptic Terminals in Neuropathic Pain Is Inhibited by the  $\alpha 2\delta$  Ligand Pregabalin. *J Neurosci*. 2009;29(13):4076–88.

- Bayer K, Ahmadi S, Zeilhofer HU. Gabapentin may inhibit synaptic transmission in the mouse spinal cord dorsal horn through a preferential block of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuropharmacology*. 2004;46(5):743–9.
- Beaumont V, Llobet A, Lagnado L. Expansion of calcium microdomains regulates fast exocytosis at ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(30):10700–5.
- Beggs S, Liu XJ, Kwan C, Salter MW. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol Pain*. 2010;6(November):1–12.
- Bekkers JM, Stevens CF. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;88(17): 7834–8.
- Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier MJ, et al. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain*. 2008;12(8):1008–17.
- Benbouzid M, Gavériaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, et al. Delta-Opioid Receptors Are Critical for Tricyclic Antidepressant Treatment of Neuropathic Allodynia. *Biol Psychiatry*. 2008;63(6):633–6.
- Benjamin ER, Pruthi F, Olanrewaju S, Shan S, Hanway D, Liu X, et al. Pharmacological characterization of recombinant N-type calcium channel (Cav2.2) mediated calcium mobilization using FLIPR. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(6):770–82.
- Bialer M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? *Epilepsia*. 2012;53:26–33.
- Biggs JE, Boakye PA, Ganesan N, Stemkowski PL, Lantero A, Ballanyi K, et al. Analysis of the long-term actions of gabapentin and pregabalin in dorsal root ganglia and substantia gelatinosa. *J Neurophysiol*. 2014;112(10):2398–412.
- Blakely RD, Edwards RH. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(2).
- Boadas-Vaello P, Castany S, Homs J, Álvarez-Pérez B, Deulofeu M, Verdú E. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: Reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord*. 2016;54(5):330–40.
- Boroujerdi A, Kim HK, Lyu YS, Kim DS, Figueroa KW, Chung JM, et al. Injury discharges regulate calcium channel alpha-2-delta-1 subunit upregulation in the dorsal horn that contributes to initiation of neuropathic pain. *Pain*. 2008;139(2):358–66.
- Bourinet E, Altier C, Salter MW, Trang T, Hildebrand ME, Zamponi GW. Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev*. 2014;94(1):81–140.

- Brawek B, Löffler M, Weyerbrock a., Feuerstein TJ. Effects of gabapentin and pregabalin on  $K^+$ -evoked  $^3H$ -GABA and  $^3H$ -glutamate release from human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;379(4):361–9.
- Brawek B, Löffler M, Dooley DJ, Weyerbrock A, Feuerstein TJ. Differential modulation of  $K^+$ -evoked  $^3H$ -neurotransmitter release from human neocortex by gabapentin and pregabalin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;376(5):301–7.
- Brockhaus J, Schreitmüller M, Repetto D, Klatt O, Reissner C, Elmslie K, et al.  $\alpha$ -Neurexins Together with  $\alpha 2\delta$ -1 Auxiliary Subunits Regulate  $Ca^{2+}$  Influx through Cav2.1 Channels. *J Neurosci.* 2018;38(38):8277–94.
- Brodbeck J, Davies A, Courtney JM, Meir A, Balaguero N, Canti C, et al. The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated  $\alpha 2\delta$ -2 protein with abnormal function. *J Biol Chem.* 2002;277(10):7684–93.
- Brown JT, Randall A. Gabapentin fails to alter P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel-mediated synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Synapse.* 2005;55(4):262–9.
- Burrone J, Neves G, Gomis A, Cooke A, Lagnado L. Endogenous calcium buffers regulate fast exocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron.* 2002;33(1):101–12.
- Bushnell MC, Čeko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(7):502–11.
- Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Hebllich F, Wratten J, Richards MW, et al. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha 2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(32):11230–5.
- Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, Pratt WS, Dolphin AC. Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary  $\alpha 2\delta$ -1 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):8979–84.
- Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, et al. The  $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell Rep.* 2018;22(9):2307–21.
- Choucair-Jaafar N, Salvat E, Freund-Mercier MJ, Barrot M. The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by  $\beta 2$  adrenoceptors and  $\delta$  opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. *Brain Res.* 2014;1546:18–26.
- Coderre TJ, Kumar N, Laferriere A, Yu JSC, Leavitt A. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem.* 2005;94:1131–9.
- Cole RL, Lechner SM, Williams ME, Prodanovich P, Bleicher L, Varney M a., et al. Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta ( $\alpha 2\delta$ ) subunit

- mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 2005;491(3):246–69.
- Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience.* 2016;338(September):230–47.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, et al. T-Cell Infiltration and Signaling in the Adult Dorsal Spinal Cord Is a Major Contributor to Neuropathic Pain-Like Hypersensitivity. *J Neurosci.* 2009;29(46): 14415–22.
- Craig AD. A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci.* 2003;26(6): 303–7.
- Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain.* 2007;131(3):243–57.
- Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RSG. Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *Eur J Neurosci.* 2004;20(6):1566–76.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS. Cell adhesion molecules: Signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(3):206–20.
- Daou I, Beaudry H, Ase AR, Wieskopf JS, Ribeiro-da-Silva A, Mogil JS, et al. Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain. *eNeuro.* 2016;3(1):1–12.
- D'Arco M, Margas W, Cassidy JS, Dolphin AC. The Upregulation of  $\alpha 2\delta$ -1 Subunit Modulates Activity-Dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Signals in Sensory Neurons. *J Neurosci.* 2015;35(15):5891–903.
- Davies A, Douglas L, Hendrich J, Wratten J, Tran Van Minh A, Foucault I, et al. The Calcium Channel  $\alpha 2\delta$ -2 Subunit Partitions with  $\text{CaV}2.1$  into Lipid Rafts in Cerebellum: Implications for Localization and Function. *J Neurosci.* 2006;26(34): 8748–57.
- Del Castillo J, Katz B. QUANTAL COMPONENTS OF THE END-PLATE POTENTIAL. *J Physiol.* 1954;124:560–73.
- Del Castillo J, Katz B. Biophysical Aspects of Neuro-muscular Transmission. *Prog Biophys Biophys Chem.* 1956;6:121–70.
- Denker A, Rizzoli SO. Synaptic vesicle pools: An update. *Front Synaptic Neurosci.* 2010;2:1–12.
- Derry S, Bell RF, Straube S, Wiffen PJ, Aldington D, Moore RA. Pregabalin for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;23(1):1–172.

- Devor M. Centralization, Central Sensitization and Neuropathic Pain. Focus on “Sciatic Chronic Constriction Injury Produces Cell-Type-Specific Changes in the Electrophysiological Properties of Rat Substantia Gelatinosa Neurons.” *J Neurophysiol.* 2006;96:522–3.
- Di Guilmi MN, Urbano FJ, Gonzalez Inchauspe C, Uchitel OD. Pregabalin Modulation of Neurotransmitter Release Is Mediated by Change in Intrinsic Activation/ Inactivation Properties of Cav 2.1 Calcium Channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336 (3):973–82.
- Dobrunz LE. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 2002;20(3–5):225–36.
- Dodge FA, Rahamimoff R. Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol.* 1967;193:419–32.
- Dolphin AC. Voltage-gated calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits: an assessment of proposed novel roles. *F1000Research.* 2018;7(0):1–14.
- Dolphin AC. The  $\alpha 2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2013;1828(7):1541–9.
- Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol.* 2016;594(19):5369–90.
- Dooley DJ, Donovan CM, Pugsley T a., Donovan CM, Pugsley T a. Stimulus-Dependent Modulation of [ $^3\text{H}$ ]Norepinephrine Release from Rat Neocortical Slices by Gabapentin and Pregabalin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(3):1086–93.
- Dooley DJ, Mieske C a., Borosky S a. Inhibition of  $\text{K}^+$ -evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci Lett.* 2000;280(2):107–10.
- Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar MM, Lagnado L. A genetically encoded reporter of synaptic activity in vivo. *Nat Methods.* 2009;6(12):883–9.
- Duehmke RM, Derry S, Bell RF, Wiffen PJ, Aldington D, Moore RA. Tramadol for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;(6).
- Dühmke RM, Hollingshead J, Cornblath DR. Tramadol for neuropathic pain (Review). *Cochrane database Syst Rev.* 2006;(3).
- Dunlop J, Bowlby M, Peri R, Vasilyev D, Arias R. High-throughput electrophysiology: An emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(4):358–68.
- Dworkin RH, O’Connor AB, Audette J, Baron R, Haanpää ML, Levy RM, et al. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin Proc. Mayo Foundation for Medical Education and Research;* 2010;85(3):S3–14.

- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. 2007;132(3):237–51.
- Eisenberg E, McNicol ED, Carr DB. Efficacy of mu-opioid agonists in the treatment of evoked neuropathic pain: Systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Pain*. 2006;10(8):667–76.
- Eroglu Ç, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Özkan E, et al. Gabapentin Receptor  $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell*. 2009;139(2):380–92.
- Fatt P, Katz B. SPONTANEOUS SUBTHRESHOLD ACTIVITY AT MOTOR NERVE ENDINGS. *J Physiol*. 1952;117:109–128.
- Fehrenbacher JC, Taylor CP, Vasko MR. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain*. 2003;105(1–2):133–41.
- Fell B, Eckrich T, Blum K, Eckrich S, Hecker D, Obermair GJ, et al.  $\alpha 2\delta 2$  Controls the Function and Trans-Synaptic Coupling of Cav1.3 Channels in Mouse Inner Hair Cells and Is Essential for Normal Hearing. *J Neurosci*. 2016;36(43):11024–36.
- Field MJ, Webb T, Cox PJ, Corradini L, Kinloch R a., Melrose H, et al. Identification of the  $\alpha 2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(46):17537–42.
- Fink K, Meder W, Dooley DJ, Göthert M. Inhibition of neuronal  $Ca^{2+}$  influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *Br J Pharmacol*. 2000;130(4):900–6.
- Finley MFA., Lubin M Lou, Neepor MP, Beck E, Liu Y, Flores CM, et al. An Integrated Multiassay Approach to the Discovery of Small-Molecule N-Type Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists. *Assay Drug Dev Technol*. 2010;8(6):685–94.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162–73.
- Finnerup, NB; Haroutnunan, S; Kamerman, P; Baron, R; Bennett, DLH; Bouhassira, D; Cruccu, G; Freeman, R; Hansson, P; Nurmikko, T; Raja, SN; Rice, ASC; Serra, J; Smith, BH; Treede, RD; Jensen T, Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, et al. Neuropathic Pain: an Updated Grading System for Research and Clinical Practice. *Pain*. 2016;In Press(00).
- Fuller-Bicer, Geraldine A. Varadi G, Koch SE, Ishii M, Bodi I, Kadeer N, Muth JN, et al. Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha 2/\delta$ -1-subunit. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2009;297(1):H117–24.

- Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. Opioid receptor genes inactivated in mice: The highlights. *Neuropeptides*. 2002;36(2–3):62–71.
- Governo RJM, Morris PG, Marsden CA, Chapman V. Gabapentin evoked changes in functional activity in nociceptive regions in the brain of the anaesthetized rat: An fMRI study. *Br J Pharmacol*. 2008;153(7):1558–67.
- Guan Z, Kuhn J a., Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, et al. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat Neurosci*. 2015;19(1):94–101.
- Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW. Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem*. 2006;97(6):1546–70.
- Hendrich J, Van Minh AT, Hebllich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3628–33.
- Hendrich J, Bauer CS, Dolphin AC. Chronic pregabalin inhibits synaptic transmission between rat dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture. *Channels*. 2012;6(2):37–41.
- Hendry SH, Hsiao S. *The Somatosensory System II. Fundamental Neuroscience: Fourth Edition*. 2012. 531-551 p.
- Hernandez-Vivanco A, Perez-Alvarez A, Caba-Gonzalez JC, Alonso MT, Moreno-Ortega a. J, Cano-Abad M, et al. Selectivity of Action of Pregabalin on Ca<sup>2+</sup> Channels but Not on Fusion Pore, Exocytotic Machinery, or Mitochondria in Chromaffin Cells of the Adrenal Gland. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(2):263–72.
- Ho K-Y, Huh BK, White WD, Yeh C-C, Miller EJ. Topical amitriptyline versus lidocaine in the treatment of neuropathic pain. *Clin J Pain*. 2008;24(1):51–5.
- Hodgkin AL, Huxley F. THE DUAL EFFECT OF MEMBRANE POTENTIAL ON SODIUM CONDUCTANCE IN THE GIANT AXON OF LOLIGO. *J Physiol*. 1952;116:497–506.
- Hoppa M, Lana B, Margas W, Dolphin A, Ryan T.  $\alpha 2\delta$  expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature*. 2012;486(7401):122–5.
- Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):202–13.
- Ikeda K, Bekkers JM. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(8):2945–50.
- Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol*. 2014;13(9):924–35.

- Joshi I, Taylor CP. Pregabalin action at a model synapse: Binding to presynaptic calcium channel  $\alpha 2\text{-}\delta$  subunit reduces neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;553(1–3):82–8.
- Kadurin I, Ferron L, Rothwell SW, Meyer JO, Douglas LR, Bauer CS, et al. Proteolytic maturation of  $\alpha 2\delta$  represents a checkpoint for activation and neuronal trafficking of latent calcium channels. *Elife.* 2016;5:1–26.
- Kaesler PS, Regehr WG. Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release. *Annu Rev Physiol.* 2013;76(1):333–63.
- Kaesler PS, Regehr WG. The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;43:63–70.
- Kimura M, Eisenach JC, Hayashida K. Gabapentin loses efficacy over time after nerve injury in rats. *Pain.* 2016;157(9):2024–32.
- Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain.* 2009;5(24):1–8.
- Lana B, Page KM, Kadurin I, Ho S, Nieto-Rostro M, Dolphin AC. Thrombospondin-4 reduces binding affinity of [ $^3\text{H}$ ]-gabapentin to calcium-channel  $\alpha 2\delta\text{-1}$ -subunit but does not interact with  $\alpha 2\delta\text{-1}$  on the cell-surface when co-expressed. *Sci Rep.* 2016;6:1–14.
- Lana B, Schlick B, Martin S, Pratt WS, Page KM, Goncalves L, et al. Differential upregulation in DRG neurons of an  $\alpha 2\delta\text{-1}$  splice variant with a lower affinity for gabapentin after peripheral sensory nerve injury. *Pain.* 2014;155(3):522–33.
- Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown JT, Donnier E, et al. Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology.* 2001;41(8):965–75.
- Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown JT, Donnier E, et al. Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology.* 2001;41(8):965–75.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain.* 2009;10(9):895–926.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, et al. Calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain.* 2006;125(1–2):20–34.
- Li YC, Kavalali ET. How Do RIM-BPs Link Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels to Evoked Neurotransmitter Release? *Neuron.* 2015;87(6):1119–21.
- Li Z, Taylor CP, Weber M, Piechan J, Prior F, Bian F, et al. Pregabalin is a potent and selective ligand for  $\alpha(2)\delta\text{-1}$  and  $\alpha(2)\delta\text{-2}$  calcium channel subunits. *Eur J Pharmacol.* 2011;667(1–3):80–90.

- Lim H, Lee H, Noh K, Lee SJ. IKK/NF- $\kappa$ B-dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury. *Pain*. 2017;158(9):1666-1677.
- Loane DJ, Lima PA, Marrion N V. Co-assembly of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *J Cell Sci*. 2007;120(6):985–95.
- Lolignier S, Eijkelkamp N, Wood JN. Mechanical allodynia. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2014;467(1):133–9.
- Lopez-Murcia FJ, Royle SJ, Llobet A. Presynaptic Clathrin Levels Are a Limiting Factor for Synaptic Transmission. *J Neurosci*. 2014;34(25):8618–29.
- Lowry., O H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–70.
- Lubin M Lou, Reitz TL, Todd MJ, Flores CM, Qin N, Xin H. A Nonadherent Cell-Based HTS Assay for N-Type Calcium Channel Using Calcium 3 Dye. *Assay Drug Dev Technol*. 2007;4(6):689–94.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, et al. Upregulation of Dorsal Root Ganglion  $\alpha 2\delta$  Calcium Channel Subunit and Its Correlation with Allodynia in Spinal Nerve-Injured Rats. *J Neurosci*. 2001;21(6):1868–75.
- Lynch ME, Campbell F. Cannabinoids for treatment of chronic non-cancer pain; a systematic review of randomized trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(5):735–44.
- Maletic V, Raison CL. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci*. 2009;14(1):5291–338.
- Maneuf YP, Blake R, Andrews NA, McKnight AT. Reduction by gabapentin of  $\text{K}^{+}$ -evoked release of  $^{3\text{H}}$ -glutamate from the caudal trigeminal nucleus of the streptozotocin-treated rat. *Br J Pharmacol*. 2004;141(4):574–9.
- Maneuf YP, Hughes J, McKnight AT. Gabapentin inhibits the substance P-facilitated  $\text{K}^{+}$ -evoked release of  $^{3\text{H}}$ glutamate from rat caudal trigeminal nucleus slices. *Pain*. 2001;93(2):191–6.
- Marais E, Klugbauer N, Hofmann F. Calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol*. 2001;59(5):1243–8.
- Marchand S. The Physiology of Pain Mechanisms: From the Periphery to the Brain. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(2):285–309.
- Margas W, Ferron L, Nieto-Rostro, ManuelaSchwartz A, Dolphin AC. Effect of knockout of  $\alpha 2\delta$ -1 on action potentials in mouse sensory neurons. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371(1700):20150430.

- Micheva KD, Taylor CP, Smith SJ. Pregabalin reduces the release of synaptic vesicles from cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*. 2006;70(2):467–76.
- Missier M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, et al.  $\alpha$ -neurexins couple  $\text{Ca}^{2+}$  channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*. 2003;423(6943):939–48.
- Mochida S, Westenbroek RE, Yokoyama CT, Itoh K, Catterall WA. Subtype-selective reconstitution of synaptic transmission in sympathetic ganglion neurons by expression of exogenous calcium channels. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(5):2813–8.
- Moulin D, Boulanger A, Clark a J, Clarke H, Dao T, Finley GA, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag*. 2014;19(6):328–35.
- Nardone R, Höller Y, Brigo F, Seidl M, Christova M, Bergmann J, et al. Functional brain reorganization after spinal cord injury: Systematic review of animal and human studies. *Brain Res*. 2013;1504:58–73.
- Neher E. Vesicle Pools and  $\text{Ca}^{2+}$  Microdomains : New Tools for Understanding Their Roles in Neurotransmitter Release. *Neuron*. 1998;20:389–99.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel  $\alpha$ 2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;95(1–2):1–8.
- Old EA, Clark AK, Malcangio M. The Role of Glia in the Spinal Cord in Neuropathic and Inflammatory Pain. *Hanbook of Experimental Pharmacology*. 2015;227: 145-170.
- Palade GE, Porter KR. Studies on the endoplasmic reticulum\* Its identification in cells in situ. *J Exp Med*. 1954;1;100(6):641–56.
- Patel MK, Gonzalez MI, Bramwell S, Pinnock RD, Lee K. Gabapentin inhibits excitatory synaptic transmission in the hyperalgesic spinal cord. *Br J Pharmacol*. 2000;130(8):1731–4.
- Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, Margas W, Ferron L, Chaggar K, et al.  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 Gene Deletion Affects Somatosensory Neuron Function and Delays Mechanical Hypersensitivity in Response to Peripheral Nerve Damage. *J Neurosci*. 2013;33(42): 16412–26.
- Patel R, Dickenson AH. Mechanisms of the gabapentinoids and  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(2).
- Perez de Arce K, Schrod N, Metzbower SWR, Allgeyer E, Kong GKW, Tang AH, et al. Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron*. 2015;88(6):1165–72.
- Perez-Gonzalez AP, Albrecht D, Blasi J, Llobet A. Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J Physiol*. 2008;586(19):4675–91.

- Perkins JR, Antunes-Martins A, Calvo M, Grist J, Rust W, Schmid R, et al. A Comparison of RNA-Seq and Exon Arrays for Whole Genome Transcription Profiling of the L5 Spinal Nerve Transection Model of Neuropathic Pain in the Rat. *Mol Pain*. 2014;10(7):1–26.
- Pitcher GM, Henry JL. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. *Exp Neurol*. 2008;214(2):219–28.
- Quintero JE, Dooley DJ, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt G a. Amperometric Measurement of Glutamate Release Modulation by Gabapentin and Pregabalin in Rat Neocortical Slices: Role of Voltage-Sensitive Ca<sup>2+</sup>  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 Subunit. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(1):240–5.
- Radat F, Margot-Duclot A, Attal N. Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: A multicentre cohort study. *Eur J Pain (United Kingdom)*. 2013;17(10):1547–57.
- Reissner C, Runkel F, Missler M. Neurexins. *Genome Biol*. 2013;14(213):261–7.
- Rizzoli SO, Betz WJ. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(1):57–69.
- Roeckel LA, Le Coz GM, Gavériaux-Ruff C, Simonin F. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*. 2016;338:160–82.
- Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005;65(6):812–9.
- Rowbotham MC, Twilling L, Reisner L, Davies PS, Mohr D, Taylor K. Oral Opioid Therapy for Chronic Peripheral and Central Neuropathic Pain. *N Engl J Med*. 2003;348(13):1223–32.
- Saarto T, Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4).
- Sadosky A, McDermott AM, Brandenburg NA, Strauss M. A Review of the epidemiology of painful diabetic peripheral neuropathy, postherpetic neuralgia, and less commonly studied neuropathic pain conditions. *Pain Pract*. 2008;8(1):45–56.
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E. Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*. 1999;23(2):399–409.
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E. Vesicle pools and short-term synaptic depression: Lessons from a large synapse. *Trends Neurosci*. 2002;25(4):206–12.
- Scott MB, Kammermeier PJ. CaV2 channel subtype expression in rat sympathetic neurons is selectively regulated by  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits. *Channels*. 2017;11(6):555–73.
- Schneider R, Hosy E, Kohl J, Klueva J, Choquet D, Thomas U, et al. Mobility of Calcium Channels in the Presynaptic Membrane. *Neuron*. 2015;86:1–8.

- Simms BA, Zamponi GW. Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(6):843–56.
- Sindrup S, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. *Pharmacology&Toxicology.* 2005;96:399–409.
- Sjöstrand FS. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J Cell Comp Physiol.* 1953;42(1):15–44.
- Smith ESJ, Lewin GR. Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol.* 2009;195(12):1089–106.
- Stahl SM, Porreca F, Taylor CP, Cheung R, Thorpe AJ, Clair A. The diverse therapeutic actions of pregabalin: Is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(6):332–9.
- Stanley EF, Gardezi SR, Li Q, Snidal CA, Chen RHC. The Calcium Channel C-Terminal and Synaptic Vesicle Tethering: Analysis by Immuno-Nanogold Localization. *Front Cell Neurosci.* 2017;11(March):1–15.
- Stevens CF, Williams JH. Discharge of the Readily Releasable Pool With Action Potentials at Hippocampal Synapses. *J Neurophysiol.* 2007;98(6):3221–9.
- Südhof TC. Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a011353.
- Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature.* 2008;455(7215):903–11.
- Südhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;1;3(12):1–14.
- Suman-Chauhan N, Webdale L, Hill DR, Woodruff GN. Characterisation of [<sup>3</sup>H]gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol.* 1993;244(3):293–301.
- Suzuki R, Rahman W, Rygh LJ, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain.* 2005;117(3):292–303.
- Svendsen KB, Jensen TS, Bach FW. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ.* 2004;329(7460):253.
- Taylor CP, Garrido R. Immunostaining of rat brain, spinal cord, sensory neurons and skeletal muscle for calcium channel alpha2-delta ( $\alpha 2\text{-}\delta$ ) type 1 protein. *Neuroscience.* 2008;155(2):510–21.

- Taylor CP. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin - Calcium channel  $\alpha 2\text{-}\delta$  [Cav $\alpha 2\text{-}\delta$ ] ligands. *Pain*. 2009;142(1-2):13-6.
- Taylor CP, Angelotti T, Fauman E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel  $\alpha 2\text{-}\delta$  (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*. 2007;73(2):137-50.
- Thanawala MS, Regehr WG. Determining synaptic parameters using high-frequency activation. *J Neurosci Methods*. 2016;264:136-52.
- Thurlow RJ, Brown JP, Gee NS, Hill DR, Woodruff GN. [ $^3\text{H}$ ]Gabapentin may label a system-L-like neutral amino acid carrier in brain. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol*. 1993;247(3):341-5.
- Tong XJ, López-Soto EJ, Li L, Liu H, Nedelcu D, Lipscombe D, et al. Retrograde Synaptic Inhibition Is Mediated by  $\alpha$ -Neurexin Binding to the  $\alpha 2\delta$  Subunits of N-Type Calcium Channels. *Neuron*. 2017;95(2):326-340.e5.
- Toth C, Mawani S, Brady S, Chan C, Liu C, Mehina E, et al. An enriched-enrolment, randomized withdrawal, flexible-dose, double-blind, placebo-controlled, parallel assignment efficacy study of nabilone as adjuvant in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2012;153(10):2073-82.
- Tran-Van-Minh A, Dolphin AC. The  $\alpha 2\delta$  Ligand Gabapentin Inhibits the Rab11-Dependent Recycling of the Calcium Channel Subunit  $\alpha 2\delta\text{-}2$ . *J Neurosci*. 2010;30(38):12856-67.
- Üçel UI, Can ÖD, Demir Özkay Ü, Öztürk Y. Antihyperalgesic and antiallodynic effects of mianserin on diabetic neuropathic pain: A study on mechanism of action. *Eur J Pharmacol*. 2015;756:92-106.
- Ulrich D, Luscher HR. Miniature excitatory synaptic currents corrected for dendritic cable properties reveal quantal size and variance. *J Neurophysiol*. 1993;69(5):1769-73.
- Ushkaryov YA, Rohou A, Sugita S.  $\alpha$ -Latrotoxin and Its Receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;184:171-206.
- Van Hooft JA, Dougherty JJ, Endeman D, Nichols RA, Wadman WJ. Gabapentin inhibits presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex. *Eur J Pharmacol*. 2002;449(3):221-8.
- Vaso A, Adahan HM, Gjika A, Zahaj S, Zhurda T, Vyshka G, et al. Peripheral nervous system origin of phantom limb pain. *Pain*. 2014;155(7):1384-91.
- Ventéo S, Laffray S, Wetzel C, Rivat C, Scamps F, Méchaly I, et al. Fxyd2 regulates A $\delta$ - and C-fiber mechanosensitivity and is required for the maintenance of neuropathic pain. *Sci Rep*. 2016;6(1):1-12.
- Villanueva L, Lopez-Avila A, Monconduit L. Ascending nociceptive pathways. *Handb Clin Neurol*. 2006;81(1996):93-102.

- Vortherms TA, Swensen AM, Niforatos W, Limberis JT, Neelands TR, Janis RS, et al. Comparative analysis of inactivated-state block of N-type (Cav2.2) calcium channels. *Inflamm Res*. 2011;60(7):683–93.
- Vranken JH. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2009;9(1):71–8.
- Wang T, Jones RT, Whippen JM, Davis GW.  $\alpha 2\delta$ -3 Is Required for Rapid Transsynaptic Homeostatic Signaling. *Cell Rep*. 2016;16(11):2875–88.
- Waxman SG, Zamponi GW. Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. *Nat Neurosci*. 2014;17(2):153–63.
- Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*. 2002;13:3614–26.
- Wiffen P, Derry S, Bell R, Rice A, Tölle T, Phillips T, et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;(6).
- Williams CL, Smith SM. Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release. *J Neurosci Res*. 2018;96(3):335–47.
- Woolf CJ. What is this thing called pain ? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742–4.
- Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*. 1983;306(15):686–8.
- Woolf CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain. International Association for the Study of Pain*; 2011;152(SUPPL.3):S2–15.
- Wu J, Yan Z, Li Z, Qian X, Lu S, Dong M, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. 2016;537(7619):191–6.
- Xiao H-S, Huang Q-H, Zhang F-X, Bao L, Lu Y-J, Guo C, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(12):8360–5.
- Yang Y, Yang F, Yang F, Fu H, Li C-L, Lu Y-F, et al. Gabapentinoid Insensitivity after Repeated Administration is Associated with Down-Regulation of the  $\alpha 2\delta$ -1 Subunit in Rats with Central Post-Stroke Pain Hypersensitivity. *Neurosci Bull. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences*; 2016;32(1):41–50.
- Yekkirala AS, Roberson DP, Bean BP, Woolf CJ. Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(8):545–64.
- Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas C, McNaughton PA. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain*. 2014;155(9):1708–19.

- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):821–70.
- Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen.* 1999;4(2):67–73.
- Zhao C, Dreosti E, Lagnado L. Homeostatic Synaptic Plasticity through Changes in Presynaptic Calcium Influx. *J Neurosci.* 2011;31(20):7492–6.
- Zhou C, Luo ZD. Electrophysiological characterization of spinal neuron sensitization by elevated calcium channel alpha-2-delta-1 subunit protein. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2014;18(5):649–58.
- Zhou C, Luo ZD. Nerve injury-induced calcium channel alpha-2-delta-1 protein dysregulation leads to increased pre-synaptic excitatory input into deep dorsal horn neurons and neuropathic allodynia. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2015;19(9):1267–76.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Artur Llobet, toda la confianza depositada en mí por escogermme para desarrollar este proyecto de investigación. Fue un gran acierto pasar a formar parte del equipo de un científico brillante, donde he podido iniciar mis conocimientos en el complejo mundo de la neurofisiología. Gracias por integrarme en tu grupo, por todos los conocimientos que me has ido transmitiendo durante estos años y por todo el apoyo personal y humano.

Del sector universitario tengo que agradecer a todo el entorno científico y personal del que he estado rodeado, liderado por el Dr. Carles Solsona. Gracias por su disposición y cercanía en todo momento. Agradecer también al Dr. Joan Blasi y a la Dra. Mireia Martín por acogerme de manera tan afable, por su calidad humana y por ofrecerme siempre su ayuda desinteresada. Joni y Marta, gracias también a los dos por vuestra ayuda, por vuestros consejos y por ser tan cercanos. Inma, eres la mejor. Te lo decimos muchas veces pero sin ti el laboratorio no sería igual. Gracias por toda tu ayuda, por preocuparte por todos e ir siempre con una sonrisa. Transmites alegría y eres una persona a la que estimo mucho personalmente. Benja eres una gran persona, siempre cercana y dispuesta a echar una mano, te agradezco toda tu ayuda y las risas que nos echamos cada vez que nos vemos. Beatrice, gracias por todo tu apoyo a nivel científico y personal. En el laboratorio de neurobiología eres un pilar fundamental, ofreciendo siempre tu ayuda desinteresada y haciendo que el ambiente de trabajo sea un lugar mucho más afable con tus conversaciones y tu alegría. Gracias por todos los consejos que me has dado y por tu ayuda en el laboratorio que sin duda me han ayudado muchísimo.

Ceci, gracias por ser un gran apoyo en el laboratorio y por tu compañerismo durante todo este tiempo. Hemos pasado muchas horas compartiendo momentos y espero que lo sigamos haciendo en el futuro. Admiro tu tesón y tu constancia y estoy seguro que vas a llegar a ser una gran científica. Empezamos juntos el camino en el laboratorio y ha sido un placer estar contigo todo este tiempo y habernos convertido en buenos amigos. Aitor, eres una persona excepcional. En poco tiempo te has convertido en uno de mis mejores amigos y estoy muy agradecido de que te hayas cruzado en mi camino. Tu calidad humana es insuperable. Eres un gran apoyo para

mí y te agradezco todas las confianzas y todo el tiempo que hemos pasado juntos. Carla y Mercé, os agradezco todo el buen rollo que generáis en el laboratorio, sois personas muy importantes para mí también y espero seguir disfrutando de cenas, birras y viajes con vosotras. Paolo, Margalida y Marina, aunque no pasarais mucho tiempo en el laboratorio aquí todos os seguimos recordando y sois geniales los tres! Os habéis convertido en buenos amigos y estoy seguro que seguiremos disfrutando de muchos momentos divertidos juntos en Barcelona.

Fran a ti te tengo que agradecer especialmente toda tu ayuda ya que fuiste la persona que más me ayudó a integrarme dentro y fuera del laboratorio nada más aterrizar en Barcelona. Coincidimos poco tiempo en el laboratorio pero fuiste un gran mentor y te agradezco especialmente todo lo que me enseñaste, a pesar de estar siempre ocupado. Durante mi primer año en el Barcelona pase muchos buenos momentos contigo y con Cris y a los dos os quiero mucho. Cris, eres una persona genial, contigo congenié desde el primer día que llegué al laboratorio y te agradezco todo tu apoyo y todos momentos que hemos pasado juntos. Eli, eres otra persona a la que estimo mucho personalmente, además de como científica. Me encantó coincidir contigo por la planta durante unos años y compartir contigo rutas de senderismo, cafés y confianzas.

Gracias también a todos los compañeros de los otros laboratorios de la planta, por los buenos momentos que hemos pasado como las escapadas rurales, mojitas, celebraciones cumpleaños... Especialmente a Xabi, Maca, Marta, Marc y Xavi.

Del sector de la empresa me gustaría agradecer especialmente al Dr. Javier Burgueño la confianza depositada en mí para desarrollar el proyecto del doctorado industrial. Gracias por todos los comentarios, por el soporte científico dado además de por enseñarme otra visión de la ciencia en la empresa y por guiarme durante mi estancia en Laboratorios Esteve. Agradecer también al Dr. Manel Merlos por sus aportaciones científicas y su visión crítica que sin duda han sido de gran ayuda para el desarrollo del proyecto. También quería darle las gracias por hacerme sentir uno más del equipo durante el tiempo que pasé en el Departamento de Screening in vitro. Xavi, a ti quiero agradecerte especialmente toda tu ayuda durante mi estancia en el Parc Científic. He aprendido otra visión de la ciencia también gracias a ti. Me sentí muy cómodo trabajando contigo y eres un gran compañero de trabajo. Gracias

por tus consejos y por tu cercanía. Albert, te agradezco todas tus aportaciones científicas al proyecto además de tu disponibilidad y amabilidad para aclararme siempre cualquier duda. Gracias por toda tu ayuda. Al resto de la gente del departamento de in vitro: Marta, Pili, Toni, Enric, Xavi, Ines.. Os agradezco a todos lo bien que me tratasteis desde el día 1 que me incorporé en la empresa y toda vuestra ayuda. Formáis un gran equipo y aprendí mucho con todos vosotros.

A los apechuscos, mi familia de Barcelona, agradeceremos a cada uno de vosotros todos los momentos que hemos pasado juntos. Lidia, una compañera de vida prácticamente, desde que te conocí en León hace once años hemos seguido caminos paralelos. Gracias por estar siempre ahí, te quiero mucho y has hecho que estos años, bien bailando salsa, saliendo a pasear o yendo de viaje, sean mucho más divertidos. Elena y Clara desde que coincidí con vosotras en el máster nos hemos hecho inseparables y espero que sea así por muchos años más. Elena, transmites alegría allá por donde vas y eres única. Clara, eres una persona magnífica y también te quiero mucho. Tenemos alguna celebración pendiente en Pepa Tomate! Cesc, compañero apechusco y del verdere, eres genial y me alegro mucho que un catalán-mexicano tan especial tuviera la suerte de conocer un día en Barcelona a mi manchega preferida y que así pasaras a formar parte de nuestras vidas. Heri, el salsero por excelencia, espero seguir disfrutando viéndote en muchos conciertos y que sigas igual de alegre siempre! Alicia, otra inseparable desde León, con tus idas y venidas por tu querida Tarragona pero volviendo siempre por Barcelona, te estimo mucho.

Por último, especialmente quiero agradecer a mi familia todos los esfuerzos y sacrificios que habéis hecho por mí para que consiga labrarme mi propio camino. Siempre me habéis animado en todo momento a perseguir mis sueños y sois los primeros que estáis siempre que os necesito. Gracias por transmitirme valores como la constancia, el esfuerzo y la humildad. Especialmente quiero agradecer todo el cariño y apoyo recibido por mis padres, por mis tíos y tías, mis dos hermanas y el sol que tengo por sobrino. Todos ocupáis un hueco especial en mi corazón.