

Geoffrey Burnstock 1929-2020

Homenaje a un neurocientífico, especialista en el sistema nervioso autónomo, pionero en la investigación de los nucleótidos extracelulares y el primero en plantear la idea y presentar sólidas evidencias en favor de la señalización purinérgica.

Claudio Coddou A.^{1,2} y J. Pablo García-Huidobro T.³

¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica el Norte y ²Millennium Nucleus for the Study of Pain (MiNuSPain) ³Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y CEDENNA.

Difícil es despedir a un maestro, a un creador incansable, a un escritor prolífico que combinó de manera insuperable la investigación científica de frontera con las vivencias familiares, el arte y la literatura. Además de investigador, esculpió acertadamente en madera, incursionó en la pintura, viajó por el planeta, leyó la literatura universal, y gozó a plenitud la música, la danza y la amistad con sus colegas y compañeros de trabajo diseminados por los 5 continentes.

Como científico destacado y neurocientífico de avanzada descubrió que los nucleótidos, las cuatro unidades básicas que forman los ácidos nucleicos tienen una doble vida tanto en el interior de todas las células como una acción extracelular. Así como las proteínas se forman por los aminoácidos que tiene múltiples roles en la fisiología celular, Burnstock y colaboradores descubren que la adenosina 5'-trifosfato, mejor conocido como ATP, tiene además de sus reconocidos roles clásicos, tales como su papel en el metabolismo energético celular, precursor de mensajeros como AMPc, sustrato de enzimas que transfieren el grupo fosfato a otras proteínas, cumple además funciones extracelulares, donde actúa como una molécula de señalización y como un neurotransmisor. Este hallazgo, ocurrido hace 48 años, constituyó en su época una total novedad, casi una herejía biológica (1). Esto constituye la base de su genialidad y enmarca el verdadero tenor de su aporte a la

biología celular moderna. Burnstock y sus colaboradores, demostraron el rol de ATP como transmisor químico de neuronas, y de señales extracelulares auto y paracrinas en una variedad de células, desde las sanguíneas, las óseas, a las vasculares, renales, hepáticas, del músculo esquelético y liso, las neuronas centrales y periféricas. Prácticamente no hay célula, animal y humana, ajena a su doble rol en la fisiología celular. Consistente con dicho rol, nucleótidos asociados como ADP, UDP, UTP, CTP, también son reconocidos por una variedad de receptores extracelulares de la membrana plasmática. Siete de estos receptores son canales iónicos (P2X) activados casi exclusivamente por ATP y derivados estructurales trifosfato, mientras otros 8 clones asociados a proteínas G (P2Y) reconocen como ligandos tanto a ADP o pirimidinas como UDP, UTP, CDP, o CTP (2). Estos receptores se han encontrado ampliamente expresados en una variedad de células del reino

Difícil es despedir a un maestro, a un creador incansable, a un escritor prolífico que combinó de manera insuperable la investigación científica de frontera con las vivencias familiares, el arte y la literatura

Geoffrey Burnstock publicó un récord inalcanzable de más de 1400 artículos científicos y fue reconocido por el ISI como el investigador más prolífico en Farmacología durante el decenio 1994-2004

animal y vegetal, desde bacterias hasta hemicordados (3). Si bien ATP es un mensajero extracelular en plantas, sus receptores vegetales son distintos a los clonados en animales (4), lo que demuestra aún más la amplitud universal de los hallazgos de Burnstock.

Como consecuencia de sus descubrimientos, se pudo dilucidar el mecanismo celular y molecular de medicamentos de uso habitual en la clínica como ticlopidina o clopidogrel y congéneres, antagonistas no competitivos y selectivos del receptor P2Y₁₂ usados como anti-agregantes plaquetarios. Hay otros compuestos purinérgicos que se están experimentando para el tratamiento del dolor, y en patología oftálmica, todos vinculados con los receptores purinérgicos ya mencionados.

Es digno de destacar que Burnstock participó proactivamente a lo largo de 60 años en muchas de estas investigaciones, contribuyendo en muchos de los descubrimientos críticos que sustentan este nuevo paradigma de la biología celular. Este hecho, puede quizás explicar que publicó un récord inalcanzable de más de 1400 artículos científicos y fue reconocido por el ISI como el investigador más prolífico en Farmacología durante el decenio 1994-2004. Más aún, el descubrimiento que ATP extracelular es una señal tan ampliamente difundida filogenéticamente, lo hace un atractivo postulante como mensajero químico ancestral, primitivo, que quizás participa desde los comienzos de la vida en esta doble funcionalidad, lo que le distingue con una rica historia desde los albores de la vida misma.

Es necesario señalar que, unido a una rica vida experimental, el profesor Burnstock mantuvo a lo largo de su carrera una dedicación docente y sobre todo no eludió la vida administrativa como director de Departamento, de Institutos y toda la distracción que estos cargos ocupan junto con la obligación de la búsqueda de recursos monetarios para sustentar sus proyectos que conducen a hallazgos experimentales. Fue tutor de más de 100 tesis doctorales y de magister tanto en Inglaterra como en otros países.

¿Cómo y dónde nació la observación original que derivó en estos conceptos?

Burnstock, usó en los 60, en Australia la técnica "sucrose gap" para medir cambios en la actividad eléctrica y contráctil de la musculatura lisa. Mediante el uso de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos reveló una actividad contráctil no-colinérgica y no-adrenérgica remanente, la que posteriormente identificó como la señalización purinérgica. Pero todo este proceso no fue para nada rápido ni mucho menos fácil; el primer paso fue satisfacer todos los criterios que se usan para determinar si una molécula puede ser denominada neurotransmisor. Estos son: ser sintetizada y almacenada por terminales sinápticos, su aplicación exógena debe producir efectos similares a los de la estimulación nerviosa, debe demostrarse su liberación después de una estimulación eléctrica por un mecanismo dependiente de calcio, y deben existir enzimas que la degraden o un mecanismo de recaptación para su inactivación. Todos estos criterios los cumplía el ATP pero faltaba uno muy importante para poder comprobar su papel como neurotransmisor: identificar un antagonista que bloquee las acciones de este, los que en ese momento aún no estaban disponibles. Sin embargo y tras leer los trabajos de Drury y Szent-Györgyi (5) que hablaban de acciones extracelulares de las purinas, y de P. Holton (6) quien describió la liberación de ATP luego de la estimulación antidrómica de nervios sensitivos, Burnstock se convence de que el ATP era el responsable de esta actividad no-colinérgica y no-adrenérgica y acuñó el término de señalización purinérgica en un trabajo seminal para el área, el que se tituló "Purinergetic Nerves" (1). Sin embargo, esta idea no fue bien recibida en la comunidad científica, debido principalmente a los ya reconocidos roles del ATP como principal fuente de energía intracelular, por lo que la idea de que además tuviese un rol extracelular fue fuertemente cuestionada por sus contemporáneos y este cuestionamiento se mantuvo por casi 20 años. De manera anecdótica se transcriben dichos sobre la hipótesis purinérgica que demuestran la audacia de Burnstock y la resistencia de la comunidad científica al desarrollo de sus ideas. "When I left Australia for University College London in 1975, at my farewell party, the Professor



Figura. De izquierda a derecha Juan Pablo García-Huidobro Toro, Geoffrey Burnstock, Sonja Buvinic y Claudio Coddou. La foto fue tomada en el XIV Congreso Mundial de Farmacología, realizado en julio del 2002 en San Francisco, USA.

Geoffrey
Burnstock: *On
one occasion,
a scientist
said to me, 'I
am going to
devote my life
to destroying
the purinergic
hypothesis'*

of Medicine introduced me as 'the inventor of the purinergic hypothesis'. Y otra frase notable que refleja la resistencia a las ideas de Burnstock: On one occasion, a scientist said to me, 'I am going to devote my life to destroying the purinergic hypothesis'.

A los pocos años de plantear su hipótesis, Burnstock descubre que el ATP también podía ser secretado desde terminales simpáticos, hecho que al principio lo desanimó e incluso lo llevó a cuestionar su hipótesis purinérgica, pero luego la pudo conciliar con el concepto de co-transmisión que nació en ese tiempo. Se postuló entonces que el ATP se co-secreta junto a la NA desde terminales simpáticos; ambos ejercen acciones complementarias. Este concepto complicó aún la transmisión simpática, pero le proporcionó a la hipótesis purinérgica un sólido sustrato neuroquímico y fisiológico. Luego de 20 años de acumular evidencias y la hipótesis seguir siendo resistida por la mayoría de la comunidad científica internacional, ocurre un hecho significativo que fue un punto de quiebre favorable a la hipótesis purinérgica de Burnstock: se identifican mediante aplicaciones de la emergente biología molecular, los primeros receptores purinérgicos. Si bien a la fecha se conocían

receptores para adenosina (Daly 1985), en la década de los noventa se clonaron los primeros receptores para nucleótidos, los primeros en identificarse fueron los receptores P2Y, los que se conocen como receptores acoplados a proteínas G (7,8). El propio Burnstock junto a su compañero de estudios, y amigo de la vida, el distinguido bioquímico y biólogo molecular, E. Barnard, descubrieron conjuntamente el primer receptor P2Y. Al año siguiente, se publica simultáneamente en la revista Nature la secuencia de dos receptores P2X, que son canales iónicos (9,10); en esta tarea no participó Burnstock directamente, pero sí A. North, un colaborador más joven y experto electrofisiólogo. Se estableció además, que la estructura de los receptores P2X es trimérica, es decir, el receptor funcional está formado por tres unidades homólogas o diferentes, lo que se ratificó con la estructura cristalina del receptor. A partir de estos hallazgos fundamentales, se produjo un crecimiento exponencial del número de investigadores dedicados al estudio de la señalización purinérgica. Quince años después, se cristalizó por primera vez parte de la secuencia del receptor purinérgico P2X4 de pez zebra (11), lo que consolidó definitivamente el concepto de la señalización purinérgica

estableciendo ligandos naturales y sintéticos de los múltiples receptores para nucleótidos y permitió entender detalles del mecanismo de apertura del canal conformado por el trímero del receptor P2X4. Quedó demostrado con total certeza que los receptores P2Y y P2X son todos diferentes a los de adenosina. Esta valiosa información validó la señalización purinérgica en una gran diversidad de tejidos y células, multiplicándose el número de investigadores purinérgicos en los 5 continentes.

Nacieron sociedades científicas tanto en Europa (como la de Italia, Alemania, España) como en América (Estados Unidos y Brasil) dedicadas a reunir especialistas en esta disciplina. Se realizan congresos anuales o bianuales de estas sociedades solas o asociadas entre sí. Cada dos años, se realiza un congreso mundial llamado "Purines", que reúne a investigadores de todo el planeta para discutir los nuevos hallazgos en torno a la señalización purinérgica. Como regla general una vez es en USA y la otra en Europa o Asia. Consciente del crecimiento de la disciplina, Burnstock y seguidores fundaron una revista internacional "Purinergic Signalling", dedicada a difundir trabajos originales o de divulgación y de discusión de la literatura en temas purinérgicos. Todo este despliegue de actividades y oportunidades que evidenciamos hoy no habría ocurrido jamás sin la perseverancia y la visión del profesor G. Burnstock, quien jamás se rindió ante las críticas y se dedicó a demostrar mediante el ejercicio del método científico la validez de su hipótesis purinérgica en la diversidad celular.

Impacto de la investigación purinérgica en Chile

En los últimos 20 años el número de investigaciones, tesis de pre-grado, magister/doctorado y las publicaciones internacionales lideradas por chilenos en el tema de la señalización purinérgica ha aumentado consistentemente. Los principales investigadores purinérgicos en Chile que sistemáticamente ha realizado publicaciones en receptores y mecanismos purinérgicos y sus líneas de trabajo incluyen a los doctores:

Claudio Acuña-Castillo, introdujo en Chile el ratón mutante de P2X7 para estudios

del P2X7R en inmunología, señalización purinérgica en células del sistema inmune en animales wt y KO P2X7R

Nelson Barrera: Biología estructural de receptores P2X y estudios de modelamiento de la modulación alostérica por metales y medicamentos; interacción de receptores P2X con otros receptores de membrana

Sonja Buvinic: Estudia aspectos moleculares de receptores purinérgicos en músculos esqueléticos de la unidad máxilo-facial, estudios en biopsias humanas. Extensión de estos estudios a epitelios de la cavidad oral.

Claudio Coddou: Inicialmente estudió e identificó los sitios de regulación alostérica de receptores P2X para metales, especies reactivas de oxígeno y sitios de fosforilación de receptores P2X. Actualmente estudia el papel de la señalización purinérgica en diversos modelos tales como el cáncer gástrico y la señalización del dolor.

Carlos Escudero: Fisiología purinérgica en vasos umbilicales y rol de nucleótidos en patologías

Jaime Eugenín: Señalización purinérgica en el tronco respiratorio y en los ritmos respiratorios. Estudios electrofisiológicos y de secreción de ATP y co-transmisores como D-serina y D-aspartato en troco cerebral y neuronas en cultivo.

Jorge Fuentealba: Estudio de la participación de Receptores purinérgicos P2XR, en la fisiopatología de enfermedades como Alzheimer y otras enfermedades neurodegeneración.

J. Pablo García Huidobro y colaboradores: Primero en estudiar señalización purinérgica en Chile, quien usó el modelo de la transmisión simpática en el conducto deferente de la rata. Pionero en el estudio en usar receptores purinérgicos artificialmente mutados expresados en oocitos de *Xenopus Laevis* para establecer el rol crítico de algunos aminoácidos en la modulación alostérica de receptores P2X por Cu(II) o Zn(II) y otros metales traza. Modelación del receptor P2X4 e identificación bioinformática de sitios y mecanismos de modulación alostérica.

Mauricio Henríquez: Papel de la señalización purinérgica en la fisiología vascular del pulmón .

Enrique Jaimovic, con la postdoc S. Buvinic establecieron el rol del ATP en la excitación contracción-transcripción del músculo esquelético; estudios tanto en fibras únicas y cultivos de células musculares. Sus investigaciones han demostrado la secreción de ATP y su funcionalidad a nivel de fibra única.

Margarita Montoya K, rol del receptor P2X7 en la señalización de citoquinas en células del sistema inmune como células NK y otras.

Juan Carlos Sáez: Especialista en la fisiología celular de conexinas y panexinas y su participación en sinapsis eléctricas; transporte de ATP por estos canales iónicos entre células y hacia el espacio extracelular.

Luis Sobrevía y colaboradores: Estudia el rol de adenosina en células HUVEC; mecanismos de transducción de señales y regulación de la expresión génica de receptores adenosina por diferentes señales

Manuel Villalón, rol del ATP y la señalización purinérgica en la fisiología de células ciliadas del tracto respiratorio humano

Proyecciones de este campo de investigaciones

Este listado de científicas y científicos interesados en la señalización purinérgica, es un fiel reflejo del creciente interés de esta disciplina a nivel nacional. Los intereses experimentales abarcan desde las neurociencias, la respuesta inmune y sus variados y complejos mecanismos, la contracción muscular esquelética y lisa, la fisiología del endotelio vascular, del epitelio respiratorio, y aspectos bioinformáticos de los receptores P2X y sus mecanismos de modulación alostérica. La transmisión purinérgica "llegó para quedarse" en la biología celular y farmacología de Chile porque ha echado profundas raíces en muchos grupos experimentales a lo largo del país. Además, este grupo tan variado de investigadores garantiza amplias proyecciones de sus estudios y hallazgos a la BioMedicina. En los últimos doce años, se han efectuado dos simposios purinérgicos al alero de la Sociedad de Farmacología de Chile y en 2008, un workshop Purinérgico internacional como parte de una reunión satélite del Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología que se

llevó a cabo en el recién inaugurado hotel Enjoy de Coquimbo en 2008. En los próximos años, sin dudas, veremos nuevos eventos y aplicaciones de las purinas a la medicina. La Sociedad de Farmacología de Chile estará atentos a estos acontecimientos.

Referencias

1. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 1972; 24(3):509-581.
2. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev*, 2011;63(3):641-683.
3. Verkhatsky A. Early evolutionary history (from bacteria to hemichordata) of the omnipresent purinergic signalling: A tribute to Geoff Burnstock inquisitive mind. *Biochem Pharmacol*, 2020. 114261. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114261.
4. Choi J, Tanaka K, Liang Y, Cao Y, Lee SY, Stacey G. Extracellular ATP, a danger signal, is recognized by DORN1 in Arabidopsis. *Biochem J*, 2014;463(3):429-437.
5. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 1929; 68(3):213-237.
6. Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol*, 1959; 145(3):494-504.
7. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*, 1993; 324(2):219-225.
8. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90(11):5113-5117.
9. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, 1994; 371(6497):519-523.
10. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 1994; 371(6497):516-519.
11. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, 2009; 460(7255):592-598.