An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 659-672

Artículo original

Los receptores de nucleótidos P2Y reducen la entrada de calcio inducida por despolarización en terminales sinápticos de cerebro medio de rata

PATRICIA MARÍN GARCÍA [1*], ROSA GÓMEZ VILLAFUERTES [2*] y JAVIER GUALIX [1]

[1] *Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.* [2] *Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid.*

* *Estos autores contribuyeron igualmente*

RESUMEN

Se han llevado a cabo estudios para determinar la presencia y función de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio. Ensayos imnunoquímicos han mostrado la expresión, en dichas terminales, de los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$. La activación de estos receptores por sus agonistas selectivos lleva a una reducción en la entrada de calcio en las terminales, inducida por agentes despolarizantes. Este efecto es similar al que producen agonistas de otros receptores metabotrópicos, como los A1 de adenosina o los $GABA_B$, conocidos por su papel en el control presináptico de la liberación de neurotransmisores.

La activación de los receptores P2Y conduce asimismo a una disminución en los niveles intrasinaptosomales de AMPc, por lo que estos receptores parecen estar acoplados negativamente a la actividad de la adenilato ciclasa. Sin embargo, se plantea como hipótesis que los receptores P2Y pudiesen actuar reduciendo la entrada de calcio en las terminales a través de la disociación de la proteína G a la que están acoplados, y la posterior acción del dímero $\beta\gamma$ sobre canales de calcio dependientes de voltaje.

Palabras clave: Receptores P2Y.—Terminales sinápticas.—Regulación presináptica.

SUMMARY

Nucleotide P2Y receptors reduce depolarization-evoked calcium entry into rat midbrain synaptic terminals

Studies were carried out to determine the presence and function of P2Y receptors in synaptic terminals from rat midbrain. Immunochemical essays have shown the expression of the nucleotide $P2Y_2$ and $P2Y_4$ receptors. Activation of these receptors induces a reduction of the calcium entrance into the terminals, when stimulated with depolarising agents. A similar effect is produced by agonists of metabotropic receptors, such as the adenosine A1 or $GABA_B$ receptors, which are well known for its role in the presynaptic control or transmitter release.

Activation of the P2Y receptors also triggers a reduction in the intrasynaptosomal cAMP concentration. Thus, these receptors seem to be negatively coupled to adenylate cyclase activity. However, we postulate that P2Y receptors are able to reduce calcium entrance into the terminals by the activation of the corresponding G protein, dissociation of the trimer and action of the βγ subunits on voltage activated calcium channels.

Key Words: P2Y receptors.—Synaptic terminals.—Presynaptic regulation.

INTRODUCCIÓN

Los terminales sinápticos contienen una gran variedad de receptores que son activados por neurotransmisores liberados desde el propio terminal o desde otros terminales o células adyacentes. Entre estos neurotransmisores se encuentran los nucleótidos que, una vez secretados al medio extracelular, regulan multitud de funciones en el sistema nervioso central y periférico (1). Para llevar a cabo su función neurotransmisora, estos compuestos se unen de manera específica a receptores de membrana denominados P2 (2). Los receptores P2 se clasifican en dos grandes grupos: receptores ionotrópicos, P2X, que constituyen canales iónicos activados por ligando y de los que se han clonado, hasta la fecha, siete subunidades distintas ($P2X_{1\text{-}7}$); o receptores metabotrópicos, P2Y, que forman parte de la superfamilia de receptores de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G, y de los cuales se han descrito ocho subtipos diferentes ($P2Y_{1,\,2,\,4,\,6,\,11,\,12,\,13,\,14}$).

Mediante el empleo de técnicas inmunoquímicas, de western blot o por ensayos funcionales, se ha demostrado la existencia de recep-

tores P2X presinápticos, fundamentalmente los constituidos por los subtipos $P2X_3$ y $P2X_7$ (3-7), aunque otras subunidades, como la $P2X_1$, $P2X_2$ o $P2X_4$, podrían también tener una localización presináptica en diferentes regiones del SNC (8-12).

Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la funcionalidad de los receptores P2X presinápticos, demostrando su presencia en terminales de cerebro medio de tipo GABAérgico, colinérgico o glutamatérgico, donde su activación conduce a la liberación del correspondiente neurotransmisor (13, 14, 15). Las terminales aminérgicas de los ganglios basales también contienen receptores ionotrópicos de ATP capaces de inducir, tras su activación, incrementos en la concentración de calcio en el interior de la terminal (16).

La facilitación de la liberación de neurotransmisores por receptores P2X presinápticos ha sido descrita también por otros autores mediante ensayos electrofisiológicos llevados a cabo en neuronas de la médula espinal o el tallo cerebral (17, 18, 19).

Aunque la existencia de receptores P2X presinápticos y su papel en el control de la liberación de neurotransmisores ha sido firmemente establecida por la abundante evidencia experimental, este no es el caso de los receptores P2Y. Diversos estudios sugieren que, en determinadas localizaciones del SN, el ATP y otros nucleótidos podrían actuar presinápticamente inhibiendo la liberación de neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de receptores de tipo P2Y (20, 21).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo ha consistido en investigar la presencia de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio de rata y su posible papel en el control de la entrada de calcio inducida por la despolarización de dichas terminales.

MÉTODOS

Preparación de sinaptosomas

Los terminales sinápticos o sinaptosomas se obtuvieron a partir de ratas Wistar macho adultas, que fueron sacrificadas por disloca-

ción cervical y posterior decapitación. Tras ello, se extrajo el cerebro y se lavó rápidamente con medio de aislamiento (sacarosa 0,32 M, TES 5 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,4) a 4º C. A continuación se separó el cerebro medio de la corteza y el cerebelo con ayuda de un bisturí. El denominado cerebro medio incluye ganglios basales, hipocampo, amígdala, diencéfalo, mesencéfalo y bulbo raquídeo. Los sinaptosomas utilizados en los experimentos de medida de Ca^{2+} y medida de AMPc se obtuvieron a partir de este área cerebral, mediante el protocolo descrito por Pintor y col. (22). Los sinaptosomas empleados en los ensayos inmunocitoquímicos fueron sometidos a una etapa adicional de purificación, empleando un gradiente discontinuo de percoll, según el método descrito por Dunkley y col. (23).

Determinación fluorimétrica de Ca^{2+} intrasinaptosomal en poblaciones

La determinación de la concentración de calcio citosólico libre en los sinaptosomas se llevó a cabo empleando el indicador fluorescente Fluo-3. Los sedimentos de sinaptosomas, conteniendo 1 mg de proteína, se resuspendieron en 500 µL de medio de incubación atemperado a 37º C. La composición del medio de incubación empleado fue la siguiente: NaCl 122 mM, KCl 3,1 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, HEPES 20 mM, glucosa 10 mM y albúmina de suero bovino (BSA) 1 g/L, pH 7,4. Los sinaptosomas se mantuvieron en agitación durante 5 minutos a 37º C. Transcurrido este tiempo, se incubaron con Fluo-3 acetoximetil éster (4 µM) y $CaCl_2$ (1,33 mM), durante 25 minutos, en agitación y a 37º C. Posteriormente, los sinaptosomas se lavaron por centrifugación en una microfuga durante 1 minuto a 16.000 x g, retirando el sobrenadante, y resuspendiendo el sedimento en 500 µL de medio de incubación sin BSA. Finalmente, esta suspensión se añadió a una cubeta de fluorímetro conteniendo 1 mL del mismo medio de incubación, suplementado con $CaCl_2$ (concentración final de Ca^{2+}: 1,33 mM). El ensayo se inició, una vez estabilizada la señal de fluorescencia basal (aproximadamente tras 1 minuto), con la adición simultánea de 4-aminopiridina (4AP) 1 mM y el correspondiente agonista P2Y. Las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión de fluorescencia se recogió a 524 nm. Los datos fueron registrados a intervalos de 0,5 segundos.

La concentración de Ca^{2+} intrasinaptosomal fue calculada a partir de las medidas de fluorescencia, empleando la ecuación de Grynkiewicz y col. (24). El valor de la constante de disociación para el complejo Ca^{2+}/Fluo-3 a 37º C y pH 7,4 se estimó en 400 nM.

Determinación de los niveles de AMPc intrasinaptosomal

Los sedimentos de sinaptosomas, conteniendo 2 mg de proteína, se resuspendieron en 1 mL de medio de incubación (composición mM: NaCl 122, KCl 3,1, $MgSO_4$ 1,2, KH_2PO_4 0,4, $NaHCO_3$ 5, HEPES 20, y glucosa 10, pH 7,4) atemperado a 37º C y se mantuvieron en agitación durante 5 minutos a esa temperatura. Transcurrido este tiempo, se incubaron con 50 μM de rolipram (un inhibidor específico de la fosfodiesterasa de AMPc) y $CaCl_2$ 1,33 mM, durante 30 minutos a 37º C. Finalmente, se estimularon con los diferentes compuestos a ensayar durante los tiempos indicados en cada caso. La estimulación se detuvo añadiendo una mezcla de ácido perclórico y EDTA para producir el lisado de las membranas, y la muestra se mantuvo en estas condiciones durante 20 minutos a 4º C. Posteriormente, el lisado de sinaptosomas se centrifugó a 13.000 x g en una microfuga durante 2 minutos a 4º C y a continuación se neutralizaron las muestras con una mezcla de KOH/TEA y se congelaron hasta su procesamiento. Los niveles de AMPc se determinaron utilizando un sistema de radioinmunoensayo suministrado en un kit por Amersham Biosciences.

Ensayos inmunocitoquímicos

Los sinaptosomas purificados por gradiente de percoll se resuspendieron en 5 mL de medio PBS (mM: NaCl 137, KCl 2,6, KH_2PO_4 1,5, Na_2HPO_4 8,1; pH 7,4) y se colocaron sobre un cubreobjetos previamente tratado con poli-L-lisina, permaneciendo así durante una hora a 37º C para permitir la adhesión de los sinaptosomas al vidrio. Una vez adheridos, los sinaptosomas se fijaron con *p*-formaldehido al 4 por 100 durante 15 minutos, se lavaron dos veces con medio PBS y se incubaron una hora, a temperatura ambiente, con una solución de bloqueo conteniendo BSA al 3 por 100, Triton X-100 al 0,1 por 100 y suero de cabra al 5 por 100 en PBS, con objeto de eliminar una posi-

ble unión inespecífica del anticuerpo. Tras dos lavados con PBS/BSA, los sinaptosomas se incubaron durante una hora a 37º C con el correspondiente anticuerpo primario: anti-$P2Y_1$ (1/100), anti-$P2Y_2$ (1/100), anti-$P2Y_4$ (1/100), anti-$P2Y_6$ (1/100) o anti-$P2Y_{11}$ (1/100), todos ellos desarrollados en conejo. Los anticuerpos empleados no se encuentran disponibles comercialmente y fueron cedidos para este estudio por Glaxo Wellcome. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS/BSA y se incubaron una hora a 37º C con el anticuerpo secundario: TRITC-anti-IgG de conejo (1:500). Por último, se realizaron tres lavados con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos, empleando un medio de montaje. Los controles se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo pero sustituyendo el anticuerpo primario por el mismo volumen de PBS/BSA.

Análisis de datos

Los datos presentados corresponden a la media ± el error estándar de la media (SEM) de al menos dos determinaciones, llevadas a cabo en diferentes preparaciones sinaptosomales. Las comparaciones entre medias se realizaron acudiendo al análisis de la *t* de Student. Un valor de $p < 0{,}05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

Identificación inmunocitoquímica de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio de rata

Para poner de manifiesto la presencia de receptores P2Y en las terminales sinápticas de cerebro medio, se llevaron a cabo estudios inmunoquímicos, empleando anticuerpos frente a diferentes subtipos de estos receptores: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ y $P2Y_{11}$.

Tras el análisis de estos experimentos se detectó marcaje positivo para los subtipos $P2Y_2$ y $P2Y_4$, como se puede observar en la Figura 1. Aunque, con los anticuerpos empleados, no se detectó ningún inmunomarcaje para los subtipos $P2Y_1$, $P2Y_6$ y $P2Y_{11}$, no se puede descartar la presencia minoritaria de estas subunidades en nuestro

modelo de sinaptosomas o en terminales sinápticas procedentes de regiones más específicas del SNC.

Acción de los agonistas P2Y sobre la entrada de calcio inducida por despolarización de las terminales

Para estudiar la funcionalidad de los receptores detectados, se ensayó el efecto de sus agonistas sobre la entrada de Ca^{2+} provocada por el agente despolarizante 4-aminopiridina (4AP).

Los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ se caracterizan por ser activados con igual potencia por los nucleótidos de adenina y uracilo, cosa que no ocurre con otros subtipos de receptores P2Y, como los $P2Y_1$, $P2Y_4$ y $P2Y_{11-13}$, activados preferentemente por las purinas, o el receptor $P2Y_{14}$, activado específicamente por UDP-glucosa. Por ello, se empleó UTP y UDP para estudiar selectivamente los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$. Como se observa en la Figura 2, ambos nucleótidos, a una concentración de 100 μM, son capaces de reducir significativamente los incrementos de Ca^{2+} inducidos por 4AP 1mM, siendo los valores medidos en presencia de UDP y UTP, respectivamente, un 93,7 ± 1,2 por 100 y un 92,8 ± 2,2 por 100 de los observados en situaciones control.

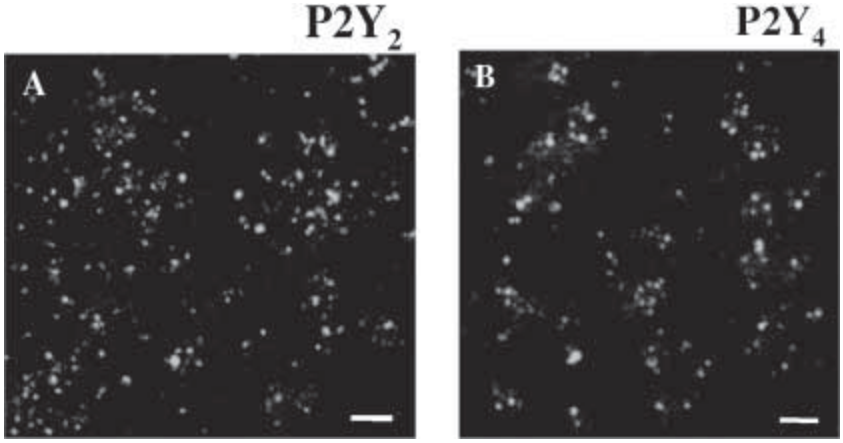

FIGURA 1. *Identificación inmunocitoquímica de los receptores P2Y en terminales nerviosas de cerebro medio de rata. En las imágenes de fluorescencia se muestra el marcaje positivo de las terminales de cerebro medio con anticuerpos frente a los receptores $P2Y_2$ (imagen A) o $P2Y_4$ (imagen B). En ambos casos, los anticuerpos anti-P2Y se revelaron con isocianato de tetrametilrodamina (TRITC). La barra de escala corresponde a 5 μm.*

El 2MeSADP (un agonista selectivo de los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_{12}$) a 10 μM no produce, sin embargo, efecto alguno. A modo comparativo, se ensayó también el efecto de otros agonistas de receptores metabotrópicos cuya localización presináptica ha sido firmemente establecida. Así, por ejemplo, se estudió el efecto de la ciclohexiladenosina (CHA), un agonista de los receptores A1; o el baclofén, un agonista selectivo de los receptores $GABA_B$. Ambos compuestos producen un efecto similar al observado para UTP y UDP, si bien CHA y baclofén fueron capaces de reducir en mayor proporción el incremento de Ca^{2+} inducido por 4AP, siendo los valores medidos en presencia de estos agonistas un 85,1 ± 4,4 por 100 y un 77,7 ± 0,6 por 100 (para CHA y baclofén, respectivamente) de los obtenidos en situaciones control (Figura 2).

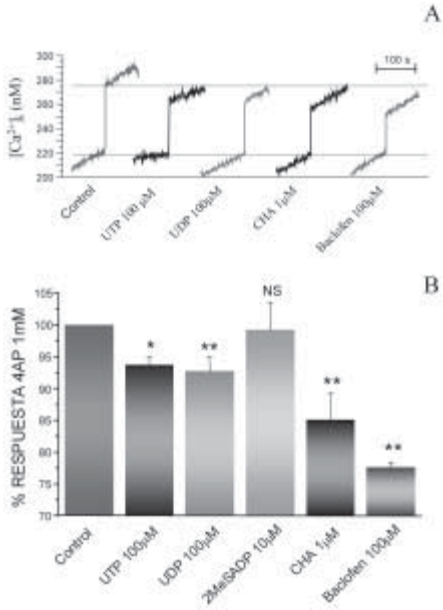

FIGURA 2. *Efecto de diversos agonistas sobre las respuestas de calcio inducidas por 4-aminopiridina. (A) Se muestran registros representativos de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por la estimulación de las terminales con 4-aminopiridina 1 mM, en ausencia (control) o en presencia de UTP, UDP, ciclohexiladenosina (CHA) o baclofén. En (B) se muestra la respuesta obtenida en presencia de cada uno de los agonistas, como porcentaje con respecto a la respuesta en condiciones control ($\Delta[Ca^{2+}]_i$ = 40,34 ± 2,01 nM), que se ha establecido como el 100 por 100. Las barras representan la media ± SEM de al menos tres experimentos en cuadriplicado (n = 3-4). NS, diferencia no significativa con respecto al control ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$), respecto al control; ** ($p < 0,01$), respecto al control.*

Acción de los agonistas P2Y sobre los niveles intrasinaptosomales de AMPc en terminales sinápticas de cerebro medio de rata

El tratamiento de los sinaptosomas durante 5 minutos con 100 μM de forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, incrementa notablemente los niveles intrasinaptosomales de AMPc, que pasan de 1,15 ± 0,02 pmol/mg proteína, en condiciones basales, a 1,89 ± 0,03 pmol/mg proteína en presencia del activador (Figura 3).

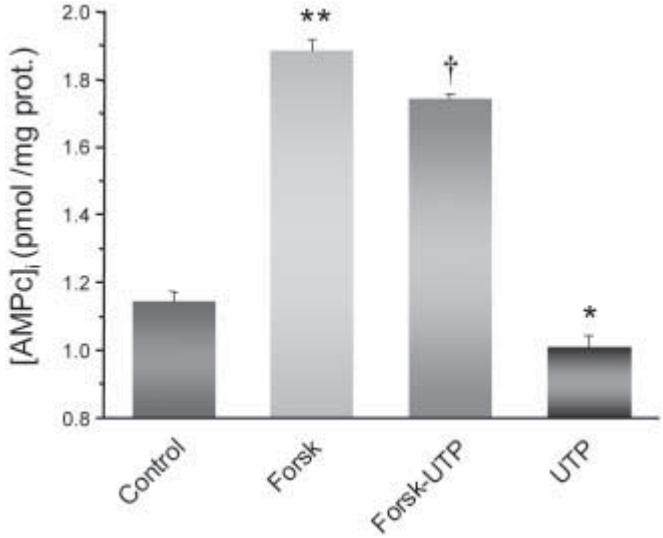

FIGURA 3. *Modulación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc por el UTP. El tratamiento de los sinaptosomas durante 5 minutos con 100 μM de forskolina incrementa los niveles de AMPc con respecto a los presentes en condiciones basales (control). El UTP, a 100 μM, disminuye los niveles basales del nucleótido cíclico y, asimismo, reduce los incrementos en la concentración de AMPc inducidos por forskolina. Las barras representan la media ± SEM de dos experimentos en cuadriplicado. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$), respecto al control. † ($p < 0,05$), respecto a la forskolina.*

El UTP, a 100 μM, es capaz de disminuir de forma significativa, tanto los niveles basales de AMPc, como los incrementos en la concentración del nucleótido cíclico inducidos por la forskolina (Figura 3). Así, los niveles basales de AMPc se reducen a un valor de

0,99 ± 0,04 pmoles/mg proteína en presencia del UTP, mientras que la forskolina sólo incrementa la concentración del nucleótido cíclico hasta un valor de 1,75 ± 0,01 pmol/mg proteína cuando el agonista P2Y esta presente en el medio.

DISCUSIÓN

Los ensayos inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ en las terminales nerviosas de cerebro medio de rata. Tras la activación de estos receptores por sus agonistas selectivos, UTP y UDP, se observa una reducción de la entrada de calcio inducida por despolarización con 4-aminopiridina. Este efecto es similar al ejercido por el baclofén y el CHA, ambos agonistas de receptores metabotrópicos (los receptores $GABA_B$ y A1, respectivamente) que son bien conocidos por su efecto inhibitorio en la liberación de neurotransmisores y la profunda depresión que causan en la transmisión sináptica.

En nuestros experimentos se observa un menor efecto de los agonistas P2Y, en la reducción de la señal de calcio en las terminales, cuando se comparan con las acciones ejercidas por los agonistas $GABA_B$ o A1. Sin embargo hay que tener en cuenta que estos últimos receptores están muy ampliamente distribuidos en las terminales de cerebro medio. Así por ejemplo, el receptor $GABA_B$ puede ser detectado mediante inmunocitoquímica en un 62 por 100 de los sinaptosomas (14). El menor efecto de UTP y UDP, comparado con GABA y CHA, podría deberse a una distribución más limitada de los receptores P2Y y su presencia en un menor numero de terminales. Aunque el efecto ejercido por los receptores P2Y, en una terminal individual, pudiera ser similar al ejercido por los receptores $GABA_B$ o A1. Para confirmar este hecho serán necesarios futuros estudios de la respuesta mediada por receptores P2Y en terminales sinápticas individuales.

Actualmente está plenamente demostrado el coalmacenamiento de ATP y otros nucleótidos, junto con neurotransmisores clásicos, en vesículas sinápticas y su consecuente secreción exocitótica (25, 26). Por otra parte, los nucleótidos pueden ser también liberados desde células gliales o por la neurona postsináptica, a través de mecanis-

mos no exocitóticos en los que presumiblemente están implicados transportadores de la familia ABC (27). Así, los nucleótidos, además de su acción excitatoria (por la facilitación de la liberación de neurotransmisores tras la activación de receptores P2X), podrían ejercer *in vivo* una acción inhibitoria de la transmisión sináptica, mediante su interacción con receptores P2Y, en aquellas áreas o vías cerebrales en las que dichos receptores tengan una presencia abundante.

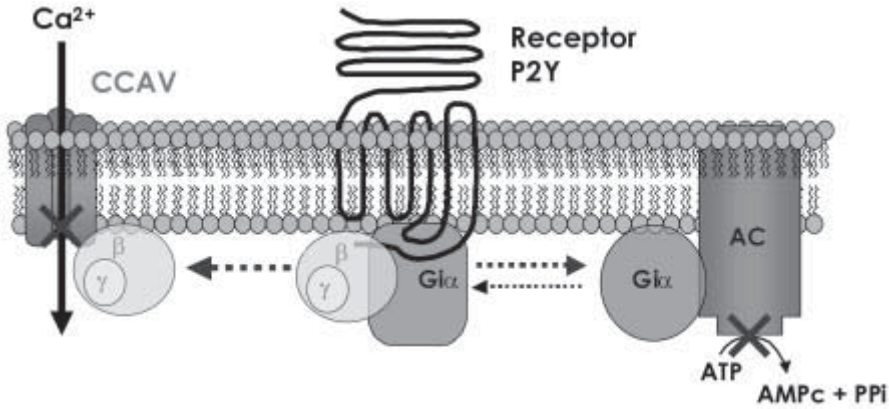

FIGURA 4. *Esquema ilustrativo del mecanismo de acción propuesto para los receptores P2Y presinápticos. La activación de los receptores P2Y presentes en las terminales sinápticas conduciría a la activación y consecuente disociación de la proteína G a la que se hallan acoplados (G_i/G_0). La subunidad α actuaría inhibiendo a la adenilato ciclasa y reduciendo los niveles intracelulares del mensajero AMPc, mientras el dímero formado por las subunidades βγ podría actuar sobre canales de calcio activados por voltaje, reduciendo la entrada de este ion a través de dichos canales y siendo así responsable de la reducción en la señal de calcio observada tras la despolarización de las terminales.*

Nuestros estudios demuestran que la activación de los receptores P2Y produce también una disminución de la concentración de AMPc (basal o estimulada con forskolina) dentro del terminal nervioso. Este resultado sugiere el acoplamiento de dichos receptores a proteínas G_i/G_0 y la inhibición de la actividad adenilato ciclasa, al igual que ocurre en el caso de los receptores A1 o $GABA_B$.

Sin embargo, uno de los mecanismos mediante el cual los receptores acoplados a proteínas G pueden modular la entrada de calcio a la célula, es la interacción directa del dímero de subunidades βγ (libera-

do tras la activación del receptor y la consecuente disociación de la proteína G) con canales de calcio dependientes de voltaje (28). Un mecanismo de este tipo ha sido descrito para receptores P2Y (29).

Por ello, nos planteamos como hipótesis para un futuro estudio si la activación de los receptores $P2Y_2$ y/o $P2Y_4$ en las terminales, que lleva a la disociación de la proteína G_i/G_0 a la que están acoplados, pudiera permitir que el complejo βγ inhibiese los canales implicados en la entrada de calcio al terminal nervioso tras la despolarización y, por tanto, la liberación de neurotransmisores dependiente de este catión (Figura 4).

BIBLIOGRAFÍA

(1) BURNSTOCK, G. (2002) Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin. Med.* 2, 45-53.

(2) RALEVIC, V. y BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413-492.

(3) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001). Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the $P2X_3$ subunits. *Neurosci. Lett.* 301, 159-162.

(4) DEUCHARS, S. A.; ATKINSON, L.; BROOKE, R. E.; MUSA, H.; MILLIGAN, C. J.; BATTEN, T. F. C.; BUCKLEY, N. J.; PARSON, S. H. y DEUCHARS, J. (2001) Neuronal $P2X_7$ receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 15, 7143-7152.

(5) LUNDY, P. M.; HAMILTON, M. G.; MI, L.; GONG, W.; VAIR, C.; SAWYER, T. W. y FREW, R. (2002) Stimulation of Ca^{2+} influx through ATP receptors on rat brain synaptosomes: identification of functional $P2X_7$ receptor subtypes. *Brit. J. Pharmacol.* 135, 1616-1626.

(6) SPERLÁGH, B.; KÖFALVI, A.; DEUCHARS, J.; ATKINSON, L.; MILLIGAN, C. J.; BUCKLEY, N. J. y VIZI, S. (2002) Involvement of $P2X_7$ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 81, 1196-1211.

(7) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, L.; HERVÁS, C.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; SEN, R. P.; GUALIX, J. y PINTOR, J. (2003) $P2X_7$ receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem. Res.* 28, 1597-1605.

(8) VULCHANOVA, L.; RIEDL, M. S.; SCHUSTER, S. J; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. y ELDE, R. (1997) Immunohistochemical study of the $P2X_2$ and $P2X_3$ receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 36, 1229-1242.

(9) LÊ, K. T.; VILLENEUVE, P.; RAMJAUN, A. R.; MCPHERSON, P. S.; BEAUDET, A. y SÉGUÉLA, P. (1998) Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83, 177-190.

(10) ATKINSON, L.; BATTEN, T. F. C. y DEUCHARS, J. (2000) $P2X_2$ immunoreactivity in the dorsal vagal complex and area postrema of the rat. *Neuroscience* 99, 683-696.

(11) LAUBE, B. (2002) Potentiation of inhibitory glycinergic neurotransmission by Zn^{2+}: a synergistic interplay between presynaptic $P2X_2$ and postsynaptic glycine receptors. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1-14.

(12) ASHOUR, F. y DEUCHARS, J. (2004) Electron microscopic localization of $P2X_4$ receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat. *Brain Res.* 1026, 44-55.

(13) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2002) Colocalisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42, 20-33.

(14) GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; GUALIX, J. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* 77, 84-93.

(15) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87, 160-171.

(16) GIRÁLDEZ, L.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; CASTRO, E. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001) Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce $[Ca^{2+}]_i$ increase in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64, 174-182.

(17) GU, J. G. y MCDERMOTT, A. B. (1997) Activation of ATP-gated P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389, 349-353.

(18) HUGEL, S. y SCHLICHTER, R. (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 20, 2121-2130.

(19) KHAKH, B. S. y HENDERSON, G. (1998) ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* 54, 372-378.

(20) KOIZUMI, S. y INOUE, K. (1997) Inhibition by ATP of calcium oscillations in rat cultured hippocampal neurones. *Brit. J. Pharmacol.* 122, 51-58.

(21) BENNETT, G. C. y BOARDER, M. R. (2000) The effect of nucleotides and adenosine on stimulus-evoked glutamate release from rat brain cortical slices. *Brit. J. Pharmacol.* 131, 617-623.

(22) PINTOR, J.; DÍAZ-REY, M. A.; TORRES, M. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (1992) Presence of diadenosine polyphosphates —Ap_4A and Ap_5A— in rat brain synaptic terminals. Ca^{2+} dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.* 136, 141-144.

(23) DUNKLEY, P. R.; JARVIE, P. E.; HEATH, J. W.; KIDD, G. J. E. y ROSTAS, J. A. P. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on percoll gradients. *Brain Res.* 372, 115-129.
(24) GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M. y TSIEN, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
(25) JO, Y.-W. y SCHLICHTER, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 241-245.
(26) POELCHEN, W.; SIELER, D.; WIRKNER, K. y ILLES, P. (2001) Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience* 102, 493-602.
(27) BALLERINI, P.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; NARGI, E.; D'ALIMONTE, I.; TRAVERSA, U.; RATHBONE, M. P. y CACIAGLI, F. (2002) Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport* 13, 1789-1792.
(28) HERLITZE, S.; GARDIA, D. E.; MACKIE, K.; HILLE, B.; SCHEUER, T. y CATTERALL, W. A. (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G protein b,g subunits. *Nature* 380, 258-262.
(29) GEREVICH, Z.; BORVENDEG, S. J.; SCHRÖDER, W.; FRANKE, H.; WIRKNER, K.; NÖRENBERG, W.; FÜRST, S.; GILLEN, C. y ILLES, P. (2004) Inhibition of N-Type Voltage-Activated Calcium Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons by P2Y Receptors Is a Possible Mechanism of ADP-Induced Analgesia. *J. Neurosci.* 24, 797-807.