

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Caracterización electrofisiológica de los receptores
P2X en macrófagos humanos”**

Eydie Mariela Vargas Martínez

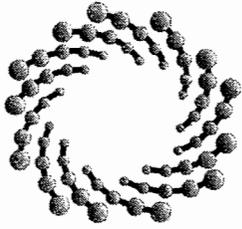
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2016



IPICYT

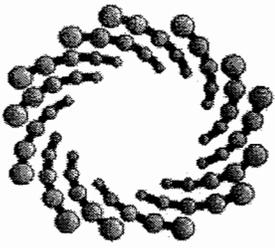
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización electrofisiológica de los receptores P2X en macrófagos humanos**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Eydie Mariela Vargas Martínez** y aprobada el **doce de julio del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas-López
Codirector de la tesis

Dra. Diana Patricia Portales Reyes
Codirector de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 148 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 09:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Dr. Carlos Barajas López
Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Presidenta
Secretario
Sinodal externo

IPICYT
IPICYT
UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Eydie Mariela Vargas Martínez

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización electrofisiológica de los receptores P2X en macrófagos humanos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López
Dra. Diana Patricia Portales Pérez (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 10:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de julio de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico





Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López y la Dra. Diana Patricia Portales Pérez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número (CVU/Becario): **634392/331785** y el apoyo de infraestructura y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dedicatorias

A mis padres Mario Rafael Vargas Vásquez y Elia Martínez Martínez y a mis hermanos Eduardo “chachito” y Lucero “bebé” que me brindan su apoyo y confianza en cada uno de mis pasos.

A mi compañero de vida Salvador y a su familia, que me abrieron las puertas de su casa y me han dado todo su apoyo.

El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito.
Alexander Fleming

Agradecimientos

Al IPICYT por el compromiso con los alumnos, por poner a nuestro alcance su infraestructura y servicios.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado.

Al Dr. Carlos Barajas López que me dio la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por creer en mí y por sus grandes consejos y opiniones, por su apoyo moral y amistad sincera.

A la Dra. Diana Patricia Portales Pérez por su opinión oportuna y excelentes comentarios, porque ella siempre estuvo al pendiente de mí, y me abrió las puertas de su laboratorio, por los consejos y el cariño a nosotros los estudiantes.

A la Dra. Leticia Santos por todas esas observaciones y comentarios oportunos que llevaron a la realización de este trabajo.

A Rosa Espinosa por tu apoyo técnico y enseñanzas por los consejos para mejorar, por tu gran labor como administradora, por tu amistad.

A mis compañeras de laboratorio Criseida, Liliana, Flor, Jesica, Gaby, Karen, Cintya y Josué por sus consejos y apoyo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Abreviaturas	ix
Glosario	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	4
Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y su diferenciación a macrófagos in vitro	4
Registros de Patch Clamp	5
RESULTADOS	6
Los cultivos de macrófagos humanos presentan fenotipos diferentes	6
Los macrófagos derivados de monocitos expresan receptores de alta sensibilidad	8
Corrientes con diferente cinética son observadas con altas concentraciones	11
Análisis de la respuesta al ATP en los macrófagos humanos con fenotipo M1 y M2	12
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	18
REFERENCIAS	19

Lista de figuras

Figura 1. Fenotipo de los macrófagos humanos en cultivos de 15 días	7
Figura 2. Corrientes de célula completa muestran diferentes cinéticas en respuesta a ATP	9
Figura 3. Curva concentración-respuesta de ATP en macrófagos humanos	10
Figura 4. Corrientes de célula completa inducidas por 1 mM de ATP	11
Figura 5. Corriente inducida en función del logaritmo de la concentración de ATP en macrófagos humanos por morfología en células redondas y alargadas	13
Figura 6. Estequiometría de canales formados por dos isoformas del receptor P2X1 y las corrientes registradas durante la expresión heteróloga de estos	17

Abreviaturas

Å	Angström
ADP	Difosfato de adenosina.
APO	Cristales de la proteína que no contengan ningún ligando en el sitio activo, llamados cristales apo.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CCL22	Quimioquina (C-C motif) ligando 22.
CD11b	Cadena α de la Integrina β 2.
CD11c	Cadena X de la integrina alfa.
CD14	Antígeno CD (clúster de diferenciación) propio del sistema inmune de mamíferos.
EC₅₀	Concentración que produce el 50% del efecto máximo del agonista.
EGTA	Ácido tetraacético de etilenglicol.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
HEPES	Ácido 4-(2 hidroxietil)- 1-piperacínil-etanosulfónico.
HLA-DR	El antígeno leucocitario humano DR.
HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1.
I_{ATP}	Corriente(s) inducidas por ATP.
IL-10	Interleucina 10.
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos.
M1	Macrófagos activados clásicamente.
M2	Macrófagos activados alternativamente.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
mV	Milivoltios.

PBS	Buffer de fosfatos salino.
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute, medio celular usado para cultivos celulares. Existe una gran variedad de medios RPMI, siendo el más usado el RPMI 1640.
SFB	Suero fetal bovino.
T	TAU constante de tiempo
TM1	Transmembrana 1.
TM2	Transmembrana 2.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.

Glosario

Antígeno: sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. Todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas.

Apoptosis: tipo de muerte celular que usan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias de una forma perfectamente controlada que minimiza el daño de las células vecinas.

Citoquinas: también denominadas citocinas son proteínas que regulan las interacciones de las células del sistema inmune entre sí y otros tipos celulares.

Conexinas: también llamadas proteínas de enlace gap, son una familia de proteínas estructurales transmembranales que se unen para formar enlaces gap en los vertebrados.

Fenotipo: es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.

Heterólogo: procedente de una especie distinta de la especie de referencia.

Necrosis: es la degeneración de un tejido por la muerte de sus células. Esta mortalidad es producida por la acción de un agente nocivo que genera una lesión irreparable.

Panexinas: se encuentran en todos los animales que forman tejidos, son proteínas que forman enlaces gap en invertebrados.

Resumen

Caracterización electrofisiológica de los receptores P2X en macrófagos humanos

Los receptores P2X se encuentran en una amplia variedad de tejidos donde han sido involucrados en diversos procesos fisiológicos. Datos experimentales indican que los macrófagos humanos expresan los receptores P2X1, P2X4 y P2X7, sin embargo, no existen estudios que caracterizen sus propiedades electrofisiológicas en estas células. Por lo tanto, en este estudio caracterizamos las corrientes mediadas por los receptores P2X en macrófagos humanos con morfología tipo M1 y M2, utilizando la técnica de *Patch Clamp* utilizando la configuración de célula completa. Monocitos de voluntarios saludables fueron cultivados por 15 días para generar macrófagos, cuyas corrientes inducidas por ATP fueron registradas. La amplitud de las corrientes incremento dependiente de la concentración de ATP (0.3 a 100 μM). La concentración del ATP requerida para inducir el 50% de la corriente máxima (EC_{50}) fue de 3.1 μM en la población general de macrófagos. Las corrientes registradas a concentraciones de ATP menores de 100 μM , disminuyen rápidamente aún en presencia del agonista. Dicha desensibilización, es bien descrita por una función exponencial. A concentraciones mayores del ATP (3-5 mM) una segunda fase fue notada donde la amplitud de las corrientes se incrementa durante la exposición continua del ATP. Estos resultados junto con observaciones recientes en monocitos sugieren que los receptores P2X1 están involucrados en estas corrientes en macrófagos.

PALABRAS CLAVE: Macrófagos, receptores P2X, Macrófagos fenotipo M1, Macrófagos fenotipo M2, ATP.

Abstract

Electrophysiological characterization of P2X receptors in human macrophages

P2X receptors are found in a wide variety of tissues where they appear to be involved in a variety of physiological processes. Experimental data indicates that human macrophages express P2X1, P2X4 and P2X7 receptors, however, there are not electrophysiological studies that characterize their properties in these cells. Therefore, the aim here was to study the currents mediated by P2X receptors in human macrophages with morphology type M1 and M2, using the whole cell configuration of the Patch Clamp techniques. Human monocytes of healthy volunteers were cultivated for 15 days to generate macrophages, which were stimulated with ATP and their membrane currents recorded. The amplitude of these currents was increased dependently of ATP concentrations (0.3 to 100 μM). The ATP concentration to induced half of the maximal responses (EC_{50}) was 3.1 μM in a general macrophage population. Currents recorded in response to lower concentrations than 100 μM , decreased rapidly, despite, the continuous presence of the agonist. This desensitization was well fitted to an exponential function. With higher ATP concentrations (3-5 mM), a second phase was noticed when the amplitude of these currents increased during the continuous presence of ATP. These results, together with recent observations in monocytes, suggest P2X1 receptors are involved in mediating these currents in macrophages.

KEYWORDS: Macrophage, P2X receptors, Macrophage phenotype M1, Macrophage phenotype M2, ATP.

INTRODUCCIÓN

Los macrófagos fueron descritos por primera vez en 1882 por Ilich Metchnikoff (25), se distribuyen en todo el organismo donde tienen una gran diversidad funcional y anatómica. Están principalmente involucrados en la eliminación de bacterias, partículas extrañas de origen no microbiano y células dañadas, además de la presentación de antígenos y la reparación del tejido lesionado, (1, 11). Los macrófagos provienen de la diferenciación de los monocitos presentes en la circulación (17, 18) y de progenitores residentes en el tejido (21, 24, 48). La diferenciación de monocitos y activación de macrófagos en respuesta a citosinas y productos microbianos dan origen a células por “activación clásica” o “activación alternativa”, mejor conocidas como macrófagos tipo M1 o M2, que alude a la nomenclatura de los linfocitos T Th1 / Th2 (35, 37, 38). Estos 2 tipos de macrófagos son distintos, no sólo en la morfología, sino también en la expresión de receptores, antígenos de superficie y citosinas que producen. Los monocitos humanos diferenciados en presencia de GM-CSF por 7 días M1, presentan una forma redondeada y los monocitos que se diferencian en presencia de M-CSF por 7 días M2, muestran macrófagos con una forma alargada y con prolongaciones (1, 16, 47).

La Adenosina trifosfato (ATP) aparte de ser una molécula que proporciona energía a los organismos vivos para llevar a cabo las reacciones bioquímicas vitales, es liberado al medio extracelular donde tiene diferentes funciones en células animales y vegetales (9, 27). En las células animales, el ATP extracelular actúa como mensajero para varios procesos fisiológicos, como la

neurotransmisión (39), agregación plaquetaria (49), la contracción muscular (5), y el crecimiento celular, diferenciación y función de las células inmunes (55). El ATP es liberado, durante diferentes procesos como en la necrosis (liberación descontrolada), lesión mecánica, apoptosis o la activación de células inflamatorias (4, 8, 14, 23). El efecto del ATP como mensajero extracelular en diversos tipos celulares, así como en los macrófagos, causa un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular e induce la liberación de HMGB1 y la producción de IL-1 β debido a la activación de los receptores purinérgicos (26, 52).

Los receptores purinérgicos P2 se dividen en 2 grandes familias: la familia de receptores metabotrópicos P2Y acoplados a proteínas G con 7 motivos transmembranales y la familia de los receptores ionotrópicos P2X que son canales iónicos que se abren en respuesta a la unión de ATP extracelular (6, 56). Existen 7 subunidades de la familia P2X: P2X1-P2X7. Cada subunidad tiene dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) unidos por un loop extracelular hidrofílico de tal manera que las terminaciones amino y carboxilo quedan en el espacio intracelular, su longitud va desde 379 (P2X6) a 595 (P2X7) aminoácidos y son codificadas por 7 genes diferentes (28, 42). Un receptor funcional está compuesto por 3 subunidades iguales (Homoméricos) o diferentes (heteroméricos). Todos los receptores P2X excepto la subunidad P2X6, forman canales homoméricos y las subunidades P2X7 no forman canales heteroméricos (54). Los receptores P2X7 tienen características cinéticas y farmacológicas distintivas. (42, 54). Los P2X se asocian con una amplia variedad de procesos fisiológicos (3, 42). Durante el proceso inflamatorio los receptores P2X participan

en la presentación de antígenos por las células dendríticas, fagocitosis (36), la liberación de citosinas pro inflamatorias y moléculas citotóxicas (33, 45), el receptor P2X7 se ha asociado con la apoptosis de células hematopoyéticas como los macrófagos y células dendríticas (10, 31) y el P2X1 es requerido por las plaquetas humanas para formar agregados en respuesta a ADP (43).

En humanos, Wang y colaboradores identificaron la expresión de mRNA de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en monocitos y células progenitoras CD34+ humanas (57). Del mismo modo, datos no publicados de nuestro laboratorio indican la presencia de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en monocitos humanos (34) y en otros trabajos se demuestra la presencia de los receptores P2X1 (20), P2X4 (51, 58) y P2X7 (19, 31, 44) en macrófagos humanos. A la fecha, no existe ningún estudio donde se analice la diferencia en la expresión de receptores P2XR en macrófagos tipo M1 y M2. Por lo cual, el objetivo de este trabajo es caracterizar electrofisiológicamente los receptores P2X en macrófagos con morfología tipo M1 y M2 derivados de monocitos humanos usando la técnica de *Patch Clamp* en su configuración célula completa para medir la actividad de estos canales.

Actualmente han sido reportadas múltiples variantes de cada subunidad, la mayoría de estas isoformas pierden uno o más exones durante el evento de splicing que pueden variar entre especies y presentan cinéticas diferentes (22, 30, 32, 41, 42), en nuestro grupo de trabajo recientemente se identificó una variante de splicing del receptor P2X1 llamada P2X1*del* en los monocitos humanos (34), la cual muestra propiedades farmacológicas y electrofisiológicas diferentes a las del receptor P2X1 canónico y que no ha sido descrita en macrófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y su diferenciación a macrófagos *in vitro*

Se obtuvieron de cuatro a seis mililitros de sangre periférica de personas voluntarias sanas, de sexo indistinto entre 21 y 30 años de edad. Que fueron diluidos en PBS a una concentración de uno a uno. Se colocaron 0.8 ml de ficoll (histopaque®-1077 Sigma-Aldrich) por cada mililitro de sangre total y se procedió a centrifugar por 20 minutos a 2500 RPM para formar el gradiente de ficoll, se separó la capa de células mononucleares (PBMC), la cual fue lavada una vez con PBS y se centrifugo 5 minutos a 1500 rpm. Los PBMC obtenidos fueron resuspendidos en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycinina y se colocó en placas de cultivo de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio circulares previamente esterilizados y desengrasados y son cultivados por 12 horas a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂ para su adherencia al vidrio. Después de este tiempo las células no adherentes fueron removidas por pipeteo suave sobre la superficie del cubreobjetos y se retiró el 50% del medio existente, reemplazándolo por medio fresco enriquecido, este procedimiento se repitió cada 2 o 3 días durante 15 días.

Registros de Patch Clamp

Los experimentos fueron realizados en presencia de Cs⁺ el cual bloquea los canales de potasio para disminuir su interferencia en los experimentos, las corrientes generadas tras la aplicación del agonista ATP fueron registradas usando la técnica de Patch Clamp en la configuración de célula completa.

Cultivos de 15 días fueron registrados con el amplificador Axopatch 200B. Las pipetas fueron fabricadas usando capilares de vidrio con filamento 1B200F-6 (World Precision Instruments, Inc.) y el estirador y pulidor de pipetas PP-830 y MF-83 (Narishigue) respectivamente. La cámara de registro contó con perfusión constante de solución externa de aproximadamente 2mL/min. La solución externa utilizada se compone (en mM): NaCl, 160; glucosa, 11; HEPES, 4.8; CsCl, 3; CaCl₂•2H₂O, 1; con un pH entre 7.3-7.4 ajustado con NaOH, mientras la solución dentro de la pipeta (en mM): CsCl, 140; NaCl, 5.5; EGTA, 10; HEPES, 5; MgCl₂, 4.5; Na-ATP, 4.5; GTP-Na 0.1 y se ajusta el pH a 7.3- 7.4 con CsOH. El potencial de membrana se fijó a -40 mV y con el fin de observar respuestas pequeñas se usó una amplificación x5. El cambio de las corrientes fueron registradas en el programa AxoScope 9 (Axón Instruments). La aplicación de concentraciones de ATP (0.3-5000 μM) se realizó con un sistema de fast flow de 8 tubos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (~23°C).

RESULTADOS

Los cultivos de macrófagos humanos presentan fenotipos diferentes

Con la finalidad de confirmar que los monocitos humanos obtenidos se diferencian de manera espontánea *in vitro* a macrófagos, se realizaron cultivos de células mononucleares donde los monocitos fueron seleccionados por adherencia al vidrio realizando un lavado a las 24 horas para eliminar las células no adherentes. Las células adheridas fueron incubadas por un periodo de 15 días durante los cuales se realizó un cambio del 50% de medio cada dos o tres días. Usando este método observamos que los macrófagos derivados de monocitos humanos incrementan su tamaño arriba de tres veces en comparación a un cultivo de monocitos. Además, estas células presentan dos morfologías diferentes; células alargadas que tienen dos o más prolongaciones y células redondas de mayor tamaño (Figura 1). En varios estudios de diferenciación con factores de crecimiento (M-CSF y GM-CSF) se asocia la forma de las células a su polarización inmunológica tipo M1 y M2 (1). Por lo cual decidimos clasificar las células en base a sus diferencias morfológicas en células con fenotipo M1 y M2. Bajo el microscopio las células de los cultivos de 15 días son refringentes, muestran una membrana consistente, se encuentran fuertemente adheridas al vidrio y presentan una población heterogénea de células alargadas y redondas que se diferencia fácilmente, además, fueron teñidos con azul de tripano y se determinó una viabilidad de $\geq 85\%$.

Una vez que se comprobó que las células de los cultivos se encuentran en buenas condiciones y que se pueden discriminar por su morfología. Se decidió

proceder el estudio y evaluarlas por técnicas electrofisiológicas para observar la respuesta de los macrófagos a diferentes concentraciones de ATP.

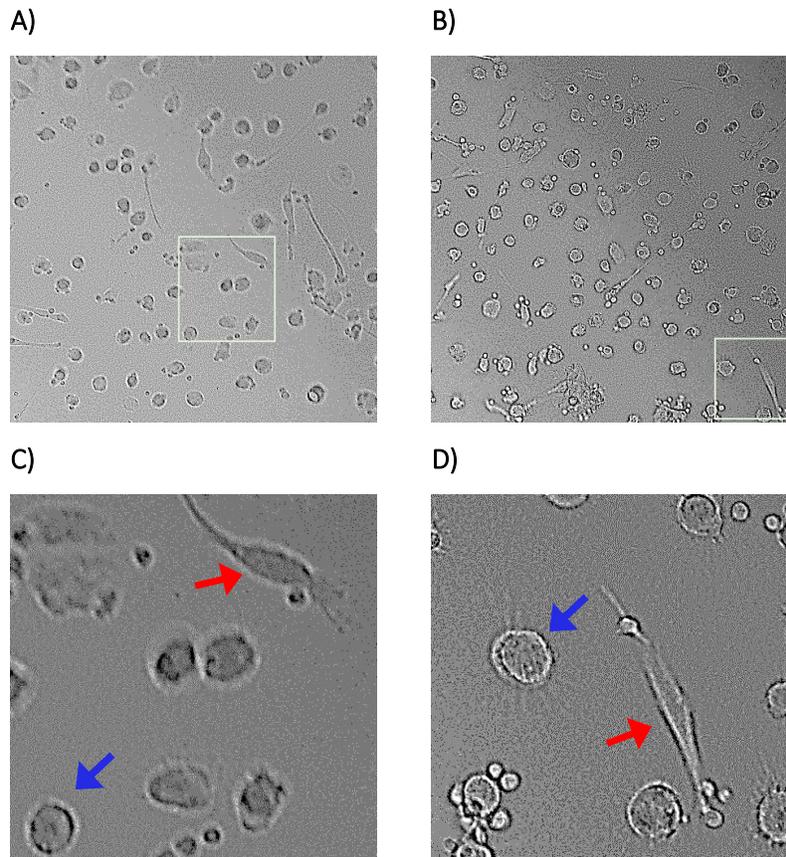


Figura 1. Fenotipo de los macrófagos humanos en cultivos de 15 días.

Cultivos de 15 días de voluntarios sanos, donde se observan macrófagos con dos morfologías diferentes; células alargadas de dos o más prolongaciones y células redondas de gran tamaño, no se observan daños visibles en la membrana. **A) y B)** Fotografías tomadas con objetivo 16X. **C) y D)** Ampliación de las regiones marcadas en el recuadro blanco de las figuras A y B respectivamente, donde se señalan con flechas rojas células alargadas y en azul células redondas. Imágenes capturadas con el microscopio Nikon Eclipse modelo ITS-FN1.

Los macrófagos derivados de monocitos expresan receptores de alta sensibilidad

Para caracterizar la población de los receptores P2X en la membrana de los macrófagos derivados de monocitos humanos, se analizaron las propiedades electrofisiológicas de las respuestas mediadas por ATP con la técnica de Patch Clamp en su configuración de célula completa. El ATP fue aplicado durante aproximadamente 5 segundos con intervalos de lavado de 5 minutos, iniciando con concentraciones bajas y aumentando gradualmente dentro de un rango de 0.3 μM a 100 μM , fijando el potencial de membrana a -40 mV (Figura 2). Este método permitió observar corrientes transitorias que disminuían rápidamente a pesar de la presencia continua del agonista, lo cual indica de la presencia de receptores P2X que responden a bajas concentraciones de ATP en los macrófagos humanos. La rápida desensibilización se observa con concentraciones hasta de 1 mM de ATP (ver Fig. 4). Las cinéticas de los receptores P2X al ATP tienen comportamientos diferentes que son propias de cada una de sus subunidades (42). Y en relación a la presencia antes descrita de los receptores P2X en los macrófagos y monocitos humanos, nosotros encontramos cinéticas muy rápidas que se observan en concentraciones bajas de ATP y que se han descrito para el receptor P2X1. Además de cinéticas que tienen un pico máximo y una desensibilización más lenta que ha sido descrita en nuestro laboratorio para el heterómero P2X1-P2X1 *del*.

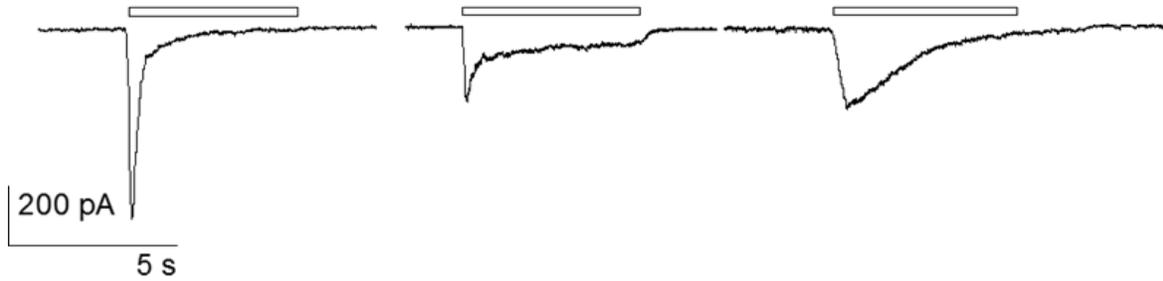


Figura 2. Corrientes de célula completa muestran diferentes cinéticas en respuesta a ATP.

Representación gráfica de corrientes producidas por la aplicación de 3 μM de ATP en diferentes células, en las tres se observa un pico de respuesta, seguida de una fase de desensibilización aun en presencia del agonista.

Las corrientes incrementaron de amplitud al elevar la concentración del ATP, observándose una respuesta máxima a 10-30 μM . La Figura 3, muestra la curva concentración-respuesta obtenida con varias concentraciones de ATP. Estos datos se ajustan bien a un modelo logístico y la concentración a la cual se obtuvo el 50% de la respuesta máxima (EC_{50}) fue calculada en 3.1 μM . Se han descrito curvas similares para el receptor P2X1 en expresión heteróloga (46). Esta sensibilidad al ATP y la rápida desensibilización de las corrientes son similares a las observadas para los receptores P2X1. La desensibilización de las corrientes inducidas por el ATP a bajas concentraciones (10 μM) tienen una cinética que se ajusta bien a una función exponencial, con constante de tiempo (τ) de 1.7 ± 0.4 segundos (n-13).

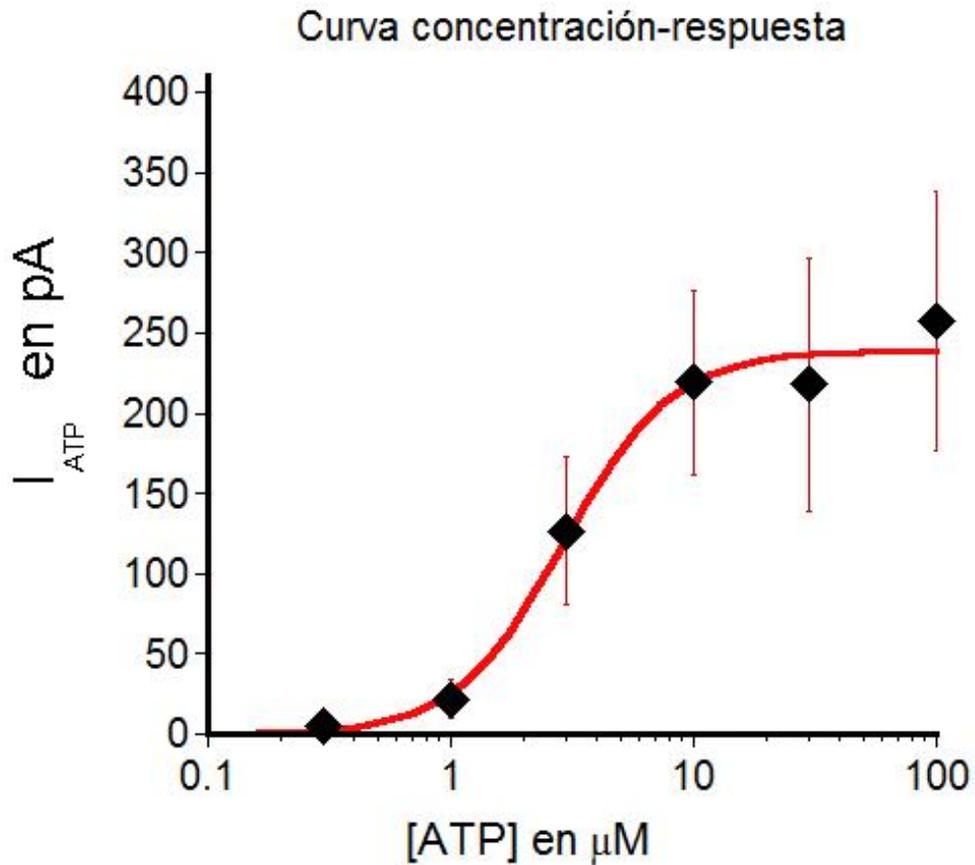


Figura 3. Curva concentración-respuesta de ATP en macrófagos humanos.

Se muestra gráfica de curva concentración-respuesta de las corrientes entrantes ante la aplicación de ATP (I_{ATP}) contra la concentración de ATP. Se observa una respuesta máxima a una concentración de 10-30 μM , lo cual indica la presencia de receptores P2X de alta sensibilidad. Los datos obtenidos se ajustaron muy bien a una curva sigmoidea (modelo logístico), esta curva tiene una EC_{50} de 3.1 μM de ATP. Cada símbolo representa el promedio de corrientes relativas de 4-16 células.

Corrientes con diferente cinética son observadas con altas concentraciones

Cuando estas células fueron estimuladas con 1 mM de ATP se observaron corrientes (Fig. 4A) con cinéticas similares a las registradas con menores concentraciones (Fig. 2). Sin embargo, en otras células se registraron corrientes con una fase de desensibilización rápida pero solo parcial, ya que después la corriente tiende a incrementar su amplitud de manera lenta (Fig. 4B). Esta conducta es más evidente a concentraciones de 3 y 5 mM de ATP. Este tipo de fenómeno ha sido descrito, en monocitos, para canales homoméricos tipo P2X1 (López-López *et al.* resultados no publicados).

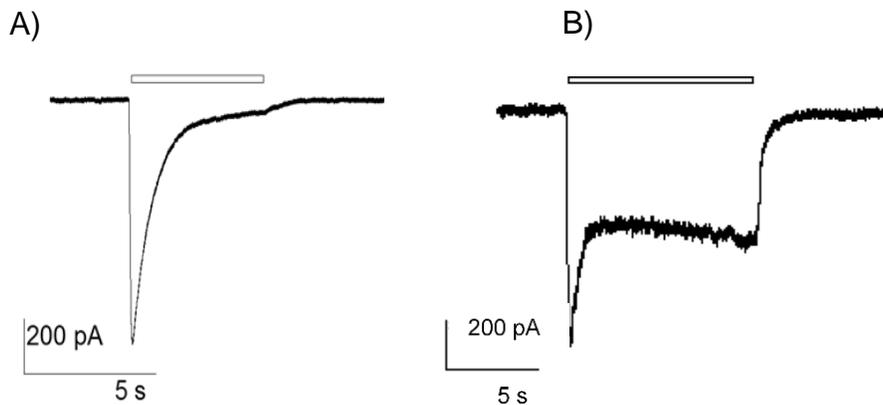


Figura 4. Corrientes de célula completa inducidas por 1 mM de ATP

Corrientes en respuesta a 1 mM de ATP (aplicado como lo indica la barra superior), donde claramente se observan dos tipos de respuestas, una que desensibiliza casi hasta desaparecer y la segunda con solo una desensibilización parcial la cual es seguida por un ligero incremento de la corriente.

Análisis de la respuesta al ATP en los macrófagos humanos con fenotipo M1 y M2

Posteriormente, se clasificaron las células por su fenotipo para analizar si existen diferencias en las poblaciones de receptores de alta sensibilidad en ambos tipos de células. Como población 1 (fenotipo 1, M1), se incluyeron a las células grandes y redondas y como población 2 (fenotipo 2, M2) a las células alargadas con dos o más prolongaciones para la población 2 como se describen en la Fig. 1-C y D. En la población de células redondas se realizaron aplicaciones de ATP siguiendo el protocolo anterior entre un rango de concentraciones de 0.3 a 100 μM y se midieron las corrientes entrantes (I_{ATP}). Las corrientes generadas se caracterizan por una desensibilización rápida y se obtuvo una curva concentración-respuesta para las células redondeadas con una EC_{50} de 2.9 μM de ATP (Fig. 5). En la población de M2 se obtuvieron registros solamente a 10 μM de. El promedio de la amplitud de las corrientes registradas en estas células son significativamente menores que el promedio observado en las M1, cuando se utilizó la misma concentración.

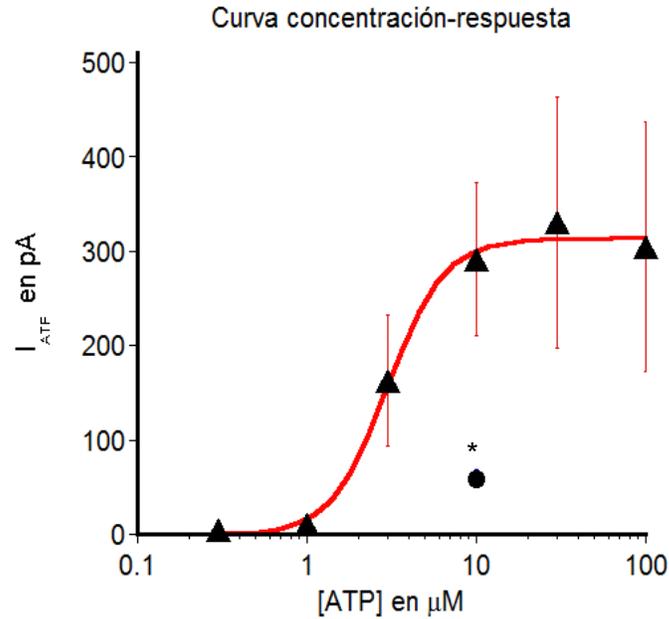


Figura 5. Corriente inducida en función del logaritmo de la concentración de ATP en macrófagos humanos por morfología en células redondas y alargadas.

La curva concentración-respuesta de macrófagos redondos (M1) tiene una respuesta máxima a 10 μM ($n=5-10$ células). El círculo representa el promedio de la corriente de tres células alargadas (M2) en respuesta a 10 μM de ATP. Este promedio es significativamente diferente ($P > 0.05$) al de las células M1.

El cálculo aproximado del área de la superficie de células de los dos fenotipos reveló que no existe diferencia entre células alargadas y redondas. Esto sugiere que la densidad de canales por unidad de área es menor en el fenotipo M2 que en el M1. Sin embargo, se requiere realizar mediciones precisas de la superficie celular para corroborar esta tendencia.

DISCUSIÓN

La evidencia presentada muestra la activación de receptores purinérgicos, P2X, con alta sensibilidad al ATP, a partir de los 0.3 μM de ATP. Las corrientes inducidas por el ATP tienen cinéticas similares a las mediadas por el receptor P2X1. Las cuales, se activan y desensibilizan rápidamente y donde la corriente entrante forma un pico y desensibiliza rápidamente aun en presencia del agonista. Sin embargo, también se observan cinéticas diferentes a bajas concentraciones que pueden deberse a la formación de canales heteroméricos con otras subunidades P2X, así como con la variante de splicing reportada en monocitos (34). Además, también se observaron corrientes que se activan con concentraciones altas de ATP, caracterizadas por dos fases durante la aplicación constante del agonista, una desensibilización rápida seguida de un incremento en la corriente. Asimismo, es importante mencionar que este es el primer estudio que investiga las diferencias en la expresión de receptores P2X en los dos fenotipos de macrófagos descritos.

Aunque actualmente los macrófagos humanos son generados *in vitro* a partir de los monocitos de sangre periférica, los protocolos aún no están plenamente definidos. La diferenciación de monocitos y activación de macrófagos en respuesta a citosinas y productos microbianos dan origen a dos tipos celulares por “activación clásica” M1 o “activación alternativa” M2, (35, 37, 38). En modelos *in vitro*, los monocitos en presencia de GM-CSF dan origen a los macrófagos tipo M1 que tienen una forma redondeada y los monocitos que se diferencian en presencia de M-CSF dan origen a los de tipo M2 con una forma alargada y con

prolongaciones (1, 16, 47), que también son diferentes en la expresión de receptores, antígenos de superficie y citosinas que producen. Sin embargo, la generación de macrófagos tipo M1 y M2 no se limita a la estimulación con factores de crecimiento. Por ejemplo, macrófagos con fenotipo M2 se producen en respuesta a adenosina (7, 15). Esto nos lleva a pensar que en modelos *in vivo* existen muchos otros factores que solos o en conjunto inducen la diferenciación preferencial de uno o ambos tipos de macrófagos en el mismo microambiente, por lo que modelos menos regulados son importantes para analizar las interacciones entre ambos tipos celulares. Nosotros generamos cultivos sin la adición de ningún estímulo que presentan células con ambos fenotipos, los días de cultivo fueron determinados por observación donde a partir de los 7 y hasta los 14 días fueron observadas en campo claro, siendo este último donde se distinguen mejor los dos fenotipos de macrófagos. Observaciones similares fueron hechas por Eligini y colaboradores que obtuvieron macrófagos M1 y M2, mediante cultivo de monocitos sin la adición de factores de crecimiento, los cuales muestran poblaciones heterogéneas, por lo que consideran “a este modelo *in vitro* idóneo para centrarse en la heterogeneidad de los macrófagos” (12, 13).

La alta sensibilidad al ATP de los receptores P2X en conjunto con la rápida cinética de la desensibilización de sus respuestas sugiere que los macrófagos humanos expresan receptores funcionales del tipo P2X1 (46). En otros estudios, se probó la participación de los receptores P2X1 y P2X7 en la infección por VIH por ensayos con antagonistas específicos (20), y la participación del receptor P2X7 en la eliminación de *Mycobacterium tuberculosis* (31, 44) y del receptor

P2X4 en macrófagos alveolares (51). Además, se ha identificado la expresión de mRNA de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en monocitos por RT-PCR de célula única donde se detectó una expresión del receptor P2X1 en el 90% de los monocitos humanos, la expresión de una variante de splicing del receptor P2X1 (P2X1*del*) en más del 85% de las células y un bajo porcentaje de expresión del P2X7R (López-López et al, resultados no publicados). Por lo cual, la probabilidad de que las corrientes registradas aquí sean mediadas por receptores P2X1 es alta.

Se pueden observar diferentes cinéticas que podrían deberse a la formación de canales heteroméricos entre los receptores P2X1 canónicos con otras subunidades, incluyendo con la variante de *splicing* reportada en monocitos. Estudios de nuestro laboratorio de canales específicos, expresados heterológamente, muestran tres tipos de corrientes con diferente cinética y sensibilidad al ATP. Así, los canales homoméricos tipo P2X1 son altamente sensibles a este agonista y desensibilizan rápidamente (Fig. 6A). Los canales homoméricos tipo P2X1*del*, son activados a concentraciones altas de ATP y tienen una lenta activación (Fig. 6B). Las corrientes observadas cuando se coexpresan las dos subunidades parecerían ser heteroméricos ya que, muestran una sensibilidad tres veces menor y una desensibilización tres veces más lenta que los receptores homoméricos P2X1 (Fig. 6C). Esto concuerda con lo descrito para otros canales heteroméricos de subunidades diferentes, las cuales tienden a compartir propiedades de los receptores homoméricos (2, 34, 40, 53). En el presente estudio, la sensibilidad al ATP y la desensibilización de las corrientes son compatibles con la existencia de receptores heteroméricos de las subunidades

P2X1 y P2X1~~del~~, como las que se muestran en la Figura 6C, sobre todo a concentraciones bajas de ATP. Sin embargo, no podemos descartar que otros tipos de receptores participen, sobre todo a concentraciones altas (p.e. P2X7), cuyas corrientes también incrementan durante la presencia continua del ATP, similares a las mediadas por los receptores P2X7 (29, 50).

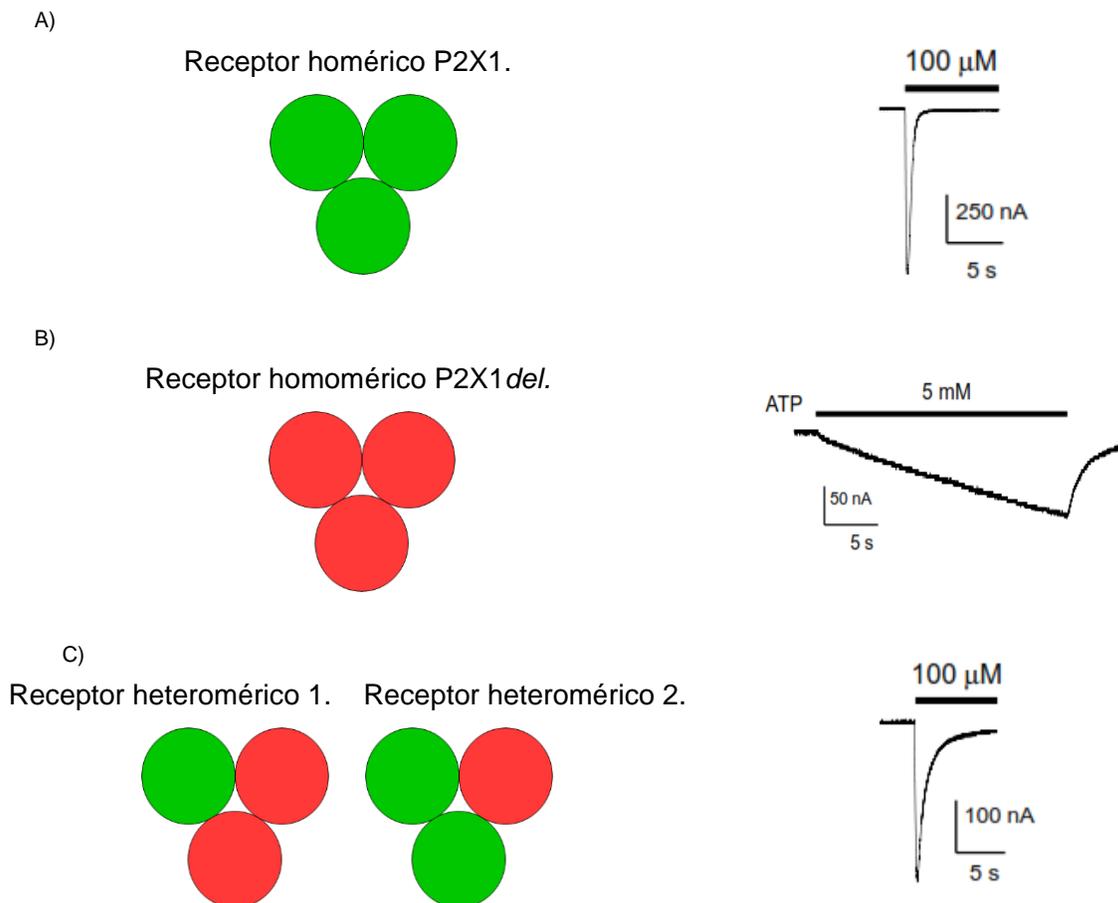


Figura 6. Estequiometría de canales formados por dos isoformas del receptor P2X1 y las corrientes registradas durante la expresión heteróloga de estos (corrientes registradas por López-López et al, resultados no publicados).

Por último, se reporta que la densidad de receptores P2X1 podría ser más baja en los macrófagos tipo M2 que en los M1. Aunque más datos son requeridos para confirmar esta tendencia. En este contexto, otros estudios realizados en macrófagos alveolares reportan que la expresión de los receptores P2X4 depende del estado de activación (51). La regulación de la expresión de los receptores P2X podría participar en la regulación fina de las funciones de los diferentes tipos de macrófagos.

CONCLUSIONES

En conclusión nuestro estudio demostró por técnicas electrofisiológicas la presencia de receptores de alta sensibilidad y rápida desensibilización en macrófagos derivados de monocitos humanos (probablemente P2X1). Se observaron respuestas con cinéticas diferentes que podrían indicar la participación de otros tipos de canales P2X, por ejemplo los P2X1 *del*, los P2X4 o los P2X7, así como posibles heterómeros de estos. También encontrados en monocitos y macrófagos. Por último, se reporta que la densidad de receptores P2X1 podría ser más baja en los macrófagos tipo M2 que en los M1. Se requieren estudios adicionales con otras técnicas para comprobar la presencia de los receptores P2X.

REFERENCIAS

1. **Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F.** Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* 11 Suppl: S32–6, 2006.
2. **Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G.** Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342: 333–43, 2004.
3. **Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R.** A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. [Online]. *FEBS Lett* 375: 129–33, 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498461> [14 Sep. 2015].
4. **Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC.** Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358–404, 2006.
5. **BURNSTOCK G, SATCHELL DG, SMYTHE A.** A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J Pharmacol* 46: 234–242, 1972.
6. **Burnstock G, Williams M.** P2 Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function and Therapeutic Potential [Online]. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 862–869, 2000. <http://jpet.aspetjournals.org/content/295/3/862.full> [25 Sep. 2015].
7. **Cekic C, Linden J.** Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16: 177–192, 2016.
8. **Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE,**

- Bayliss DA, Ravichandran KS.** Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467: 863–7, 2010.
9. **Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR.** Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* 17: 3019–34, 2005.
 10. **Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RDC, Perfettini J-LL, Neto ACTDS, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM.** P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells [Online]. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C1139–1147, 1999. <http://ajpcell.physiology.org/content/276/5/C1139.abstract> [3 Sep. 2015].
 11. **Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H.** Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 57: 421–31, 2002.
 12. **Eligini S, Brioschi M, Fiorelli S, Tremoli E, Banfi C, Colli S.** Human monocyte-derived macrophages are heterogenous: Proteomic profile of different phenotypes. *J Proteomics* 124: 112–123, 2015.
 13. **Eligini S, Crisci M, Bono E, Songia P, Tremoli E, Colombo GI, Colli S.** Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J Cell Physiol* 228: 1464–72, 2013.
 14. **Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Küper N, Karcher C, Weissmüller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP.** ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99: 1100–8, 2006.
 15. **Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, Leibovich SJ.** The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation* 36: 921–31, 2013.

16. **Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA.** GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* 86: 411–21, 2009.
17. **Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua W-J, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ.** Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13: 1118–28, 2012.
18. **GORDON S.** Biology of the Macrophage. *J Cell Sci* 1986: 267–286, 1986.
19. **Gu BJ, Zhang WY, Bendall LJ, Chessell IP, Buell GN, Wiley JS.** Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. [Online]. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1189–97, 2000. <http://ajpcell.physiology.org/content/279/4/C1189.abstract> [17 Sep. 2015].
20. **Hazleton JE, Berman JW, Eugenin EA.** Purinergic receptors are required for HIV-1 infection of primary human macrophages. *J Immunol* 188: 4488–95, 2012.
21. **Hoeffel G, Ginhoux F.** Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol* 6: 486, 2015.
22. **Housley GD, Greenwood D, Bennett T, Ryan AF.** Identification of a short form of the P2xR1-purinoceptor subunit produced by alternative splicing in the pituitary and cochlea. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 501–8, 1995.
23. **Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK.** Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509: 310–7, 2014.
24. **Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE.** Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332: 1284–8, 2011.

25. **Karnovsky ML.** Metchnikoff in Messina — A Century of Studies on Phagocytosis — NEJM [Online]. *N Engl J Med* 304: 1178–1179, 1981. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198105073041923> [7 Sep. 2015].
26. **Kawano A, Tsukimoto M, Mori D, Noguchi T, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S.** Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 102–7, 2012.
27. **Khakh BS, Burnstock G.** The double life of ATP. [Online]. *Sci Am* 301: 84–90, 92, 2009. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2877495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [13 May 2016].
28. **Khakh BS.** Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2: 165–74, 2001.
29. **Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F.** Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X 7 receptor. *J Physiol* 534: 25–35, 2001.
30. **Koshimizu T, Tsujimoto G.** Functional role of spliced cytoplasmic tails in P2X2-receptor-mediated cellular signaling. [Online]. *J Pharmacol Sci* 101: 261–6, 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891773> [15 May 2016].
31. **Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS.** ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors. *Immunity* 7: 433–444, 1997.
32. **Liñan-Rico A, Jaramillo-Polanco J, Espinosa-Luna R, Jiménez-Bremont JF, Liñan-Rico L, Montañó LM, Barajas-López C.** Retention of a new-defined intron changes pharmacology and kinetics of the full-length P2X2 receptor found in myenteric neurons of the guinea pig. *Neuropharmacology* 63: 394–404, 2012.

33. **Lopez-Castejon G, Theaker J, Pelegrin P, Clifton AD, Braddock M, Surprenant A.** P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *J Immunol* 185: 2611–2619, 2010.
34. **López-López C, Guerrero-Alba R, Valdez-Morales E, Espinosa Luna-R, Portales-Pérez D y B-LC.** Caracterización Electrofisiológica y Molecular de los Receptores P2X en Monocitos Humanos. In: *LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Cd. de Tlaxcala, Tlaxcala, México.* 2013.
35. **Mantovani A, Sica A, Locati M.** Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344–6, 2005.
36. **Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, Coutinho-Silva R.** Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* 216: 1–11, 2011.
37. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166–73, 2000.
38. **Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher E a., Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton J a., Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey K, Sica A, Suttles J, Udalova I, vanGinderachter J a., Vogel SN, Wynn T a.** Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41: 14–20, 2014.
39. **Newman EA.** Glial Cell Inhibition of Neurons by Release of ATP [Online]. *J Neurosci* 23: 1659–1666, 2003. <http://www.jneurosci.org/content/23/5/1659.short> [14 May 2016].
40. **Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F.** Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J Neurochem* 92: 925–33, 2005.
41. **Nicke A, Kuan Y-H, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O,**

- Górecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F.** A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284: 25813–22, 2009.
42. **North RA.** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013–67, 2002.
43. **Oury C, Toth-Zsomboki E, Van Geet C, Thys C, Wei L, Nilius B, Vermlyen J, Hoylaerts MF.** A natural dominant negative P2X1 receptor due to deletion of a single amino acid residue. *J Biol Chem* 275: 22611–4, 2000.
44. **Placido R, Auricchio G, Falzoni S, Battistini L, Colizzi V, Brunetti E, Di Virgilio F, Mancino G.** P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol* 244: 10–8, 2006.
45. **Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR.** Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179: 1913–25, 2007.
46. **Rettinger J, Schmalzing G.** Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121: 451–61, 2003.
47. **Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH.** In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7: e42656, 2012.
48. **Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F.** A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90, 2012.
49. **Soslau G, Youngprapakorn D.** A possible dual physiological role of

extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1355: 131–140, 1997.

50. **Stokes L, Jiang L-H, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A.** Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol* 149: 880–7, 2006.
51. **Stokes L, Surprenant A.** Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *Eur J Immunol* 39: 986–95, 2009.
52. **SuellenD'arc Santos Oliveira, FerreiraNanini H, Savio LEB, CaldasWaghbi M, Claudia Lucia Martins Silva and Robson Coutinho-SilvaSuellenD'arc Santos Oliveira, 1, 2, 3 Hayandra FerreiraNanini, 1 Luiz Eduardo Baggio Savi 2 and Robson Coutinho-Silva.** Macrophage P2X7 receptor function is Reduced during Schistosomiasis: Putative role of TGF-B1 [Online]. *Hindawi* 2014: 12, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024943> [26 Aug. 2015].
53. **Surprenant A, Schneider DA, Wilson HL, Galligan JJ, North RA.** Functional properties of heteromeric P2X1/5 receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst* 81: 249–263, 2000.
54. **Torres GE, Egan TM, Voigt MM.** Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits: SPECIFICITIES EXIST WITH REGARD TO POSSIBLE PARTNERS. *J Biol Chem* 274: 6653–6659, 1999.
55. **Trautmann A.** Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. *Sci Signal* 2: pe6, 2009.
56. **Vitiello L, Gorini S, Rosano G, Ia Sala A.** Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 120: 511–8, 2012.
57. **Wang L, Jacobsen SEW, Bengtsson A, Erlinge D.** P2 receptor mRNA

expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol* 5: 16, 2004.

58. **Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Górecki DC.** Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis* 15: 212–220, 2004.