



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Población de receptores P2X en
macrófagos de humano**

Tesis que presenta

Eydie Mariela Vargas Martínez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras de la Tesis:

Dra. Ana María Estrada Sánchez

Dra. Raquel Guerrero Alba

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2020.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Población de receptores *P2X* en macrófagos de humanos” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Eydie Mariela Vargas Martínez** y aprobada el **05 de noviembre 2020** 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.

Dra. Ana María Estrada Sánchez
Co-directora de tesis

Dra. Raquel Guerrero Alba
Co-directora de tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial



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, que actualmente está a cargo de la Dra. Ana María Estrada Sánchez y en el Laboratorio de Electrofisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, a cargo de la Dra. Raquel Guerrero Alba.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número **331785** y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

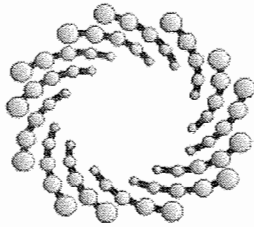
Esta tesis fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología mediante el proyecto de ciencia básica coordinado por la UNAM con numero 219859

Dedicatorias

A mi Familia, Mario Rafael Vargas Vásquez y Elia Martínez Martínez, a mis hermanos Eduardo “chachito” y Lucero “bebé”. A Chava y mi otra familia que me brindan su apoyo, cariño y confianza a cada momento y en cualquier proyecto.

“El éxito de un minuto paga el fracaso de años”

Robert Browning, poeta.



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 116 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Ana María Estrada Sánchez	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Eydie Mariela Vargas Martínez

sobre la Tesis intitulada:

Población de receptores P2X en macrófagos de humano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana María Estrada Sánchez
Dra. Raquel Guerrero Alba (UAA)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:52 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 30 días del mes de noviembre de 2020.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Agradecimientos

Al IPICYT por poner a nuestro alcance su infraestructura y servicios.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado.

Al Dr. Carlos Barajas López que nos ofreció una oportunidad de crecer profesionalmente y sobre todo su amistad sincera, en paz descanse.

A la Dra. Raquel Guerrero Alba por su gran dedicación e incansable labor científica, por abrirme las puertas de su laboratorio en un momento tan crítico. y siempre brindar su apoyo moral y amistad.

Al Dr. Luis Montaña, Dr. Sergio casas y Dra. Leticia Santos, que evaluaron el desarrollo del proyecto, por su tiempo invertido y consejos.

Al Dr. Tonatiuh que me capacito en el uso y manejo de equipos de biología molecular, por su desempeño como administrador en el laboratorio, y amistad.

Al Dr. Eduardo Valdez, por su increíble capacidad de resolver problemas técnicos y su habilidad con el equipo de electrofisiología, gracias por enseñarme, y repetir a todos que no está enojado, es usted un gran amigo.

A Rosa Espinosa por tu apoyo técnico y tu lucha por sus alumnos, por los consejos para mejorar, por tu amistad.

A mis compañeros en Aguascalientes Cristian, Ray, Emilio Renata entre otros, sin su tiempo y amistad me habría desanimado

Y a mis amigos de San Luis Ángeles, Karen, Fernanda, Edmar, Iván, Jorge, Alma y Adriana hicieron muy divertidos mis años en San Luis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	¡Error! Marcador no definido.
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice de figuras	x
Abreviaturas y símbolos	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Population of P2X receptors on human macrophages	xiv
1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1. El sistema inmune	3
2.2. Macrófagos	5
2.3. Señalización purinérgica en macrófagos	6
2.4. Receptores P2X	8
3. ANTECEDENTES	10
4. JUSTIFICACION	11
5. HIPOTESIS	12
6. OBJETIVO GENERAL	12
6.1. Objetivos específicos	12
7. MATERIALES Y METODOS	13
7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y diferenciación a macrófagos derivados de monocitos (MDM)	13

7.2. RT-PCR de célula única	13
7.3. Registros electrofisiológicos por la técnica de patch-clamp	14
7.4. Expresión heteróloga del receptor P2X1 humano en Oocitos de <i>Xenopus Laevis</i>	15
7.5. Soluciones y reactivos	16
7.6. Análisis de datos	17
8. RESULTADOS	17
8.1. El ARNm de las subunidades P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 se expresan en los macrófagos de humano	17
8.2. Una concentración baja de ATP indujo dos tipos diferentes de corrientes en macrófagos de humano	19
8.3. Concentraciones altas de ATP inducen tres respuestas diferentes en los macrófagos de humano	21
8.4. Efectos del PPADS sobre las I_{ATP} en macrófagos de humano	23
8.5. Efecto de la ivermectina sobre los receptores P2X nativos en macrófagos de humano	24
8.6. Efecto del antagonista A-804598 sobre los receptores P2X nativos de macrófagos de humano	26
8.7. Comparación de la respuesta de ATP en macrófagos de humano con la respuesta P2X1 de humano recombinante	27
8.8. Efectos de la suramina sobre las I_{ATP} 0.001 mM en macrófagos y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano	29
8.9. Efectos de la suramina sobre las I_{ATP} 5 mM en macrófagos y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano.	30
9. DISCUSION	31
10. CONCLUSION	37
11. BIBLIOGRAFIA	38

ANEXOS	48
Anexo A: Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-PCR de célula única.	48
Anexo B: publicaciones	49

Índice de figuras

Figura 1. Cinéticas de los receptores P2X homoméricos inducidas por ATP extracelular..	9
Figura. 2. Expresión de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en macrófagos de humano	18
Figura 3. Respuestas P2X activadas por baja concentración de ATP en macrófagos de humano.....	20
Figura 4: Respuestas obtenidas al aplicar una alta concentración de ATP en macrófagos de humano	22
Figura 5: PPADS inhibe las corrientes de desensibilización rápida inducidas por ATP 0.01 mM en macrófagos de humano	24
Figura 6: La ivermectina potenció las corrientes de desensibilización lenta inducidas por ATP 0.01 mM en macrófagos de humano	25
Figura 7: El antagonista A-804598 inhibió las corrientes no desensibilizantes inducidas por 5 mM de ATP, sin afectar las corrientes bifásicas en macrófagos de humano	26
Figura 8. Las propiedades de las corrientes mediadas por el receptor P2X1 homomérico de humano expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> se asemejan a las observadas para los receptores P2X nativos en macrófagos de humano.....	28
Figura 9. La suramina provoca potenciación e inhibición de las I_{ATP} (0.01 mM) en macrófagos de humano y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano homomérico	30
Figura 10. La suramina inhibe las I_{ATP} 5 mM en macrófagos de humano y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano homoméricos	31

Abreviaturas y símbolos

°C	Grados centígrados
μl	Microlitros
τ	Tau constante de tiempo
α,β-meATP	α,β-Metil-adenosina-5-trifosfato
AD	Análogo-digital
ATP	Adenosina-5-trifosfato
Ca(NO ₃) ₂	Nitrato de calcio
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio di hidratado
cDNA	ADN complementario
CsOH	Hidróxido de cesio
CXCL5	Quimiocina 5 con motivo C-X-C
CO ₂	Dióxido de carbono
CsCl	Cloruro de cesio
DEPC	Del inglés; Diethyl pyrocarbonate; pirocarbonato de dietilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleósido trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentración efectiva media máxima
EGTA GAPDH	Del inglés Ethylene Glycol Tetraacetic Acid; ácido egtazico
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP-NA	Guanosina 5 trifosfato sodio
HEPES	Del inglés: N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HMGB1	Del inglés High mobility group box 1
I _{ATP}	Corriente inducida por ATP
IL-1β	Interleucina 1 beta
KCl	Cloruro de potasio
LANBAMA	Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental

MDM	Macrófagos derivados de monocitos
mg/ml	Miligramos por mililitros
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de manganeso
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mV	Milivoltios
Na-ATP	Adenosina-5-trifosfato – sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	bicarbonato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng/ml	Nanogramos sobre mililitros
NMDG⁺	N-metil-D-glucamina
pA	Pico amperios
pb	Pares de bases
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
RNAsas	Ribonucleasa
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa
SEM	Error estándar de la media
TEVC	Patch-clamp de voltaje de dos Electroodos
U	Unidades
U/ml	Unidades por mililitros
ml/min	Mililitros por minuto

Resumen

Población de receptores P2X en macrófagos de humano

Los receptores P2X se expresan en distintos tejidos y están involucrados en diferentes funciones fisiológicas. En los macrófagos de humanos, la presencia de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 ha sido demostrada. Sin embargo, sus propiedades farmacológicas y sus funciones son poco conocidas y controversiales. Por tal motivo, el objetivo de este estudio es examinar la expresión de las subunidades P2X1, P2X4, P2X7 y P2X1del una variante de “splicing” del P2X1 encontrada en monocitos, así como, caracterizar la respuesta de los receptores P2X nativos en macrófagos derivados de monocitos periféricos humanos (MDM). Utilizando la técnica de PCR en célula única se demostró la presencia de ARNm de la subunidad P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 en el 40 %, 5 %, 20 % y 90 % de los macrófagos. De los cuales, el 25 % co-expresaron el ARNm de las subunidades P2X7 y P2X1; el 5 % P2X7 y P2X4; y el 15 % co-expresaron el ARNm de las subunidades P2X7, P2X4 y P2X1. Mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa, la aplicación de 0.01 mM ATP provocó corrientes entrantes de activación rápida y dos cinéticas de desensibilización diferentes. La primera mostró una desensibilización rápida inhibida por 1 μ M de PPADS que asemeja a las propiedades del receptor P2X1. La segunda mostró una corriente de desensibilización lenta, insensible a PPADS, pero potenciada con 3 μ M de ivermectina similar a las propiedades reportadas para el receptor P2X4. La aplicación de una concentración alta de ATP (5 mM) indujo tres tipos de corrientes, la primera de activación lenta no-desensibilizante, similar a la reportada para el receptor P2X7 en el 69 % de los macrófagos de humanos e inhibida por 0.1 μ M de A-804598; el segundo tipo de corriente mostró una activación y desensibilización rápida, presente en el 15 % de las células; y el tercer tipo fue una corriente de activación rápida con una desensibilización bifásica observada en el 15 % de los macrófagos. Tanto la cinética de desensibilización rápida como la bifásica fueron muy similares a la observada para el receptor P2X1 humano recombinante expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos datos demuestran por primera vez la co-expresión del ARNm y la presencia de receptores funcionales de las subunidades P2X1, P2X4, y P2X7 en macrófagos de humanos.

PALABRAS CLAVE: macrófagos de humano, P2X1, P2X4, P2X7

Abstract

Population of P2X receptors on human macrophages

P2X receptors are expressed in different tissues and are involved in different physiological functions. In human macrophages, the presence of the P2X1, P2X4 and P2X7 receptors has been demonstrated. However, its pharmacological properties and functions are poorly understood and controversial. For this reason, the objective of this study is to examine the expression of the P2X1, P2X4, P2X7 and P2X1 subunits of a variant of P2X1 “splicing” found in monocytes, as well as to characterize the response of native P2X receptors in macrophages derived from peripheral monocytes. humans (MDM). Using the single cell PCR technique, the presence of P2X1, P2X1del, P2X4 and P2X7 subunit mRNA was demonstrated in 40 %, 5 %, 20 % and 90 % of macrophages. Of which, 25 % co-expressed the mRNA of the P2X7 and P2X1 subunits; 5 % P2X7 and P2X4; and 15 % co-expressed the mRNA of the P2X7, P2X4 and P2X1 subunits. Using the patch-clamp technique in its whole cell configuration, the application of 0.01mM ATP elicited fast-activating inward currents and two different desensitization kinetics. The first showed rapid desensitization inhibited by 1 μ M PPADS that resembles the properties of the P2X1 receptor. The second showed a slow desensitization current, insensitive to PPADS, but enhanced with 3 μ M of ivermectin like the properties reported for the P2X4 receptor. The application of a high concentration of ATP (5 mM) induced three types of currents, the first one of slow non-desensitizing activation, similar to that reported for the P2X7 receptor in 69 % of human macrophages and inhibited by 0.1 μ M. from A-804598; the second type of current showed rapid activation and desensitization, present in 15 % of the cells; and the third type was a fast activating current with biphasic desensitization observed in 15 % of macrophages. Both the rapid and biphasic desensitization kinetics were similar to that observed for the recombinant human P2X1 receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. These data demonstrate for the first time the co-expression of mRNA and the presence of functional receptors for the P2X1, P2X4, and P2X7 subunits in human macrophages.

KEY WORDS: human macrophages, P2X1, P2X4, P2X7

1. INTRODUCCION

El Adenosin-5-trifosfato (ATP) es la principal fuente de energía en las células y está presente en altas concentraciones (5 – 10 mM) en el espacio citoplasmático (Di Virgilio, 2005). La liberación de ATP intracelular puede ocurrir en respuesta a estimulación mecánica (hinchazón o encogimiento osmótico de las células) o señales bioquímicas extracelulares (interacción célula-patógeno, daño tisular, muerte celular, etc.) (Corriden, Insel, 2010; Idzko et al., 2014). Varios tipos de canales de membrana median la liberación de ATP como son hemicanales de conexinas y panexinas (Chekeni et al., 2010; Huang et al., 2007; Kang et al., 2008), canales de maxi-aniones (Bell et al., 2003; H.-T. Liu et al., 2008) y canales aniónicos regulados por volumen (Hisadome et al., 2002). Además de la liberación a través de los canales, las células pueden liberar ATP por exocitosis (Geoffrey Burnstock, 2007; Gatof et al., 2004). Al ser una molécula ubicua, el ATP puede ser liberado de distintas células, por ejemplo: neuronas (Evans et al., 1992), leucocitos de sangre periférica humana (De Ita et al., 2016), células epiteliales (Homolya et al., 2000), endoteliales (Bodin, Burnstock, 2001) y de fragmentos citoplasmáticos como plaquetas (Idzko et al., 2014). Varios tipos de células inmunes, incluidos los macrófagos, responden al ATP extracelular como una señal de peligro (Geoffrey Burnstock, Boeynaems, 2014; Corriden, Insel, 2010; Francesco Di Virgilio, 2005).

El ATP extracelular ejerce una amplia gama de efectos celulares a través de la activación de dos clases de receptores localizados en la membrana plasmática denominados P2Y y P2X. Los receptores P2Y están acoplados a proteínas G y en células de mamíferos se han reportado ocho subtipos de receptores P2Y, dos de los cuales se activan de manera preferencial por ATP (P2Y2 y P2Y11) (Abbracchio et al., 2006), mientras que los otros 6 (P2Y1, P2Y4, P2Y6, P2Y12, P2Y13 y P2Y14) son activados por ADP, UTP, UDP y UDP-glucosa (F. Di Virgilio, Adinolfi, 2017). La familia de los receptores P2X son canales iónicos que se abren en respuesta a la unión de ATP extracelular. En mamíferos, incluidos los humanos, se han identificado 7 subunidades (P2X1-P2X7) que están ampliamente distribuidos en los tejidos tanto excitables (que producen potencial de acción: neuronas, músculos) como no

excitables (que producen respuesta a estímulos sin generar potencial de acción) y están involucrados en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas (Svennersten et al., 2015; Vulchanova et al., 1996; Worthington et al., 1999).

Los receptores P2X se asocian con una amplia variedad de procesos fisiológicos del sistema inmunológico (Marques-da-Silva et al., 2011). Por ejemplo, se ha demostrado su participación en la liberación de citocinas proinflamatorias y moléculas citotóxicas (Lopez-Castejon et al., 2010; Qu et al., 2007). Algunos estudios en macrófagos y monocitos humanos han reportado la presencia de los receptores P2X1 (Hazleton et al., 2012), P2X4 (Stokes, Surprenant, 2009; Yeung et al., 2004), P2X5 y P2X7 (Gu et al., 2000; Janks et al., 2019; Lammas et al., 1997; Placido et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado la presencia de una variante de “splicing” del receptor P2X1, la cual pierde 17 aminoácidos en el exón 6 (P2X1del) en la mayoría de los monocitos humanos, y mediante su expresión heteróloga se mostró que es funcional, aunque con baja sensibilidad al ATP (López-López et al., 2016). Su cinética fue similar a la descrita para el receptor P2X7 recombinante (L Gudipaty et al., 2001; R Alan North, 2002). Además, las corrientes mediadas por receptores homoméricos P2X1 o P2X1del aumentaron en amplitud cuando se activaron con alta concentración de ATP (López-López et al., 2016), una propiedad también similar a la del receptor P2X7 (L Gudipaty et al., 2001). En este contexto, algunos estudios han propuesto que los canales P2X7 contribuyen a las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) en macrófagos de humano (Eschke et al., 2002) y han sugerido que el receptor P2X7 está involucrado en la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas (Arulkumaran et al., 2011; Portales-Cervantes et al., 2010; D. F. Virgilio et al., 2017). Sin embargo, se requiere una concentración de ATP ≥ 1 mM para activar el receptor P2X7 recombinante (R Alan North, 2002), y en los estudios mencionados anteriormente, se usó una concentración de ATP 0.1 mM para determinar el efecto de varios antagonistas del receptor P2X7. Además, también asumieron que BzATP es un agonista específico del receptor P2X7. Sin embargo, se informó que este agonista es inactivo en P2X7 recombinante, cuando se utilizó una solución de NaCl extracelular (Fonfria et al., 2008).

Por otro lado, otros estudios farmacológicos sugieren que solo el receptor P2X4 contribuye a la respuesta evocada por ATP en macrófagos de humano (J. A. Layhadi, Fountain, 2019; J. A. Layhadi et al., 2018; J. Layhadi, Fountain, 2017). Todas estas inconsistencias hacen suponer que los efectos del ATP en macrófagos no son mediados exclusivamente por receptores P2X7. Por lo tanto, como parte de nuestro esfuerzo para comprender las propiedades de los receptores P2X en macrófagos de humano, se examinó la expresión y co-expresión de las subunidades P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 mediante la técnica de RT-PCR en célula única y se caracterizó la respuesta electrofisiológica y farmacológica de los receptores P2X usando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa. Los datos obtenidos en este trabajo apoyan la participación funcional de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en las I_{ATP} en macrófagos de humano.

2. MARCO TEORICO

2.1. El sistema inmune

El sistema inmunitario es un conjunto complejo de moléculas, células, órganos y tejidos que se encargan de proteger al organismo. Diariamente existen diversas situaciones que perturban la homeostasis, desde factores ambientales, exposición a toxinas, presencia de microorganismos, proliferación de células cancerosas, entre otras. El sistema inmunitario es el encargado de identificar y eliminar estos agentes causantes de daño (Delves, Roitt, 2000; Rankin, Artis, 2018). La respuesta inmune se clasifica en dos tipos: innata y adaptativa.

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa contra patógenos, no es específica y está presente desde el nacimiento. Se compone por la barrera epitelial y una gran variedad de células (células epiteliales, neutrófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos y células asesinas naturales o “natural killer”). Cuando ocurre un daño en la barrera epitelial, aparte de la entrada de patógenos existe un daño de tejido, lo cual conlleva a la activación del sistema inmunitario innato, esta forma de inmunidad se inicia por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés,

Pathogen-associated molecular patterns), como los lipopolisacáridos y los peptidoglucanos (Abdallah et al., 2017; Quaresma, 2019), y patrones moleculares asociados a daños (DAMPs, del inglés, Damage-associated molecular pattern) que son una amplia variedad de moléculas intracelulares como las proteínas de choque térmico (HSPs; por sus siglas en inglés heat shock protein), histonas, glicano, fibrinógeno, ATP, entre muchas otras, que se liberan cuando el tejido sufre un estrés o daño (Huber-Lang et al., 2018). Estos PAMPs y DAMPs son reconocidos mediante los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés, de Pattern Recognition Receptor) los cuales activan la inducción de varias citocinas proinflamatorias, quimiocinas e interferones. Entre estos receptores podemos encontrar los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés, Toll like receptors), receptores tipo RIG1 (RLRs, por sus siglas en inglés, RIG-1 like receptors), Receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés, NOD like receptors), y los receptores tipo lectina C (CLRs, por sus siglas en inglés, C-type Lectin Receptors) y receptores de ADN (Iwasaki, Medzhitov, 2015; Kumar et al., 2011). Además de los antes mencionados, los DAMPs pueden ser reconocidos por receptores purinérgicos (A1, P2X y P2Y) (Roh, Sohn, 2018).

La respuesta inmune adaptativa por otro lado se activa en fases tardías de un proceso infeccioso y se caracteriza por ser una respuesta específica dirigida hacia el tipo de antígeno detectado en la lesión. La inmunidad adaptativa está integrada por los linfocitos T y B. Hay 2 clases de linfocitos T: los linfocitos T CD8+ o citotóxicos, que reconocen y destruyen las células infectadas por bacterias o virus, y los linfocitos T CD4+ o cooperadores, que coordinan la respuesta inmunitaria al estimular otras células inmunes, como macrófagos, linfocitos B y T CD8+ para combatir la infección (Iwasaki, Medzhitov, 2015; Schenten, Medzhitov, 2011). Los linfocitos B se encargan de la producción de anticuerpos, cada célula B lleva un receptor único para los antígenos denominado receptor de células B (BCR). Los linfocitos B reconocen antígenos en su forma tridimensional y tras el reconocimiento del antígeno por el BCR, las células B reactivas proliferan para aumentar su número y diferenciarse para secretar su anticuerpo específico. Las células B también pueden sufrir una mutación somática de los genes de la porción variable del

anticuerpo expresado para alterar y mejorar la especificidad y afinidad hacia los antígenos (Abbas, 2015; Nemazee, 2017).

2.2. Macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmunitario que se encuentran distribuidas en todos los tejidos donde realizan diferentes funciones como la eliminación de bacterias, partículas extrañas de origen no microbiano y células dañadas, así como, la presentación de antígenos, la reparación del tejido lesionado y la eliminación de restos celulares (Akagawa et al., 2006; Djaldetti et al., 2002).

Los macrófagos se originan por la diferenciación de los monocitos de la sangre al migrar hacia los tejidos (Gautier et al., 2012; S. Gordon, 1986; Takahashi, 2000) y de progenitores que residen en tejidos (Hoeffel, Ginhoux, 2015; Jenkins et al., 2011; Lavin et al., 2015; Schulz et al., 2012). En condiciones fisiológicas, los macrófagos modulan sus aspectos morfológicos y funcionales en respuesta a su microambiente tisular, dando lugar a su especialización en los tejidos, como los macrófagos alveolares en los pulmones, las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos de la lámina propia en el intestino y la microglía en el cerebro (Eligini et al., 2015; Gautier et al., 2012; Siamon Gordon, Taylor, 2005). Bajo estímulos patológicos, como microbios o daño tisular, la activación de los macrófagos se caracteriza por varios aspectos distintos que dan lugar a fenotipos de macrófagos con funciones distintas y específicas. Actualmente se acepta ampliamente que los macrófagos activados por mediadores solubles, como las citocinas INF- γ (interferón gamma) y TNF- α (del inglés, tumor necrosis factor alfa), o por ligandos de los receptores PRRs (vía clásica) se denominan macrófagos M1, mientras que, los macrófagos activados por otras moléculas como IL-4, IL-10, IL-13 (interleucinas 4, 10 y 13 respectivamente), glucocorticoides, entre otros (vía alternativa) relacionados con las respuestas de inmunoregulación y remodelación del tejido, se les denomina macrófagos M2. Para referirse a cada forma en particular, se propone denominar como M2a a la activación inducida por IL-4 e IL-13; M2b a la promovida por la exposición a complejos inmunes y agonistas de los TLRs y M2c a la estimulada por

IL-10 y glucocorticoides (Duque Correa, Rojas López, 2007; Lawrence, Natoli, 2011; Y. C. Liu et al., 2014; Murray, Wynn, 2011).

El estudio de los macrófagos tisulares es complejo debido a esta heterogeneidad inducida por el microambiente local y además se requiere de técnicas especiales e invasivas, razón por la cual muchos de los estudios actuales se llevan a cabo en líneas celulares inmortalizadas o macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos. Los monocitos derivados de macrófagos son generados a partir de la estimulación con diversas citocinas entre ellas el factor estimulante de colonias de monocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés, Macrophage Colony-Stimulating Factor) los cuales dan lugar a macrófagos M1 y M2, respectivamente (Akagawa et al., 2006; Fleetwood et al., 2009).

Los macrófagos expresan una gran variedad de glicoproteínas receptoras en la membrana que le ayudan a realizar sus funciones biológicas, como interactuar con otras células, con compuestos de células y tejidos dañados y contra microorganismos. La activación de los receptores membranales conlleva generalmente a cambios superficiales, señalización intracelular y expresión de genes, lo que contribuye a la homeostasis, la defensa del huésped, y la inducción de la inmunidad innata y adquirida. (Siamon Gordon et al., 2020; Taylor et al., 2005)

2.3. Señalización purinérgica en macrófagos

Las purinas son compuestos orgánicos que se encuentran en todas las células y forman parte de diferentes compuestos como nucleótidos, nucleósidos, componentes de coenzimas, mediadores celulares entre otros. Altas concentraciones de ATP intracelular a menudo favorecen la apoptosis, mientras que un nivel bajo a menudo promueve la necrosis, por lo que el proceso de apoptosis se puede convertir en necrosis si hay un consumo excesivo de ATP intracelular o inhibición de la síntesis de ATP (Chen et al., 2018). Por otro lado, su presencia en el espacio extracelular actúa como mensajero que media funciones celulares

biológicas, principalmente dentro de los procesos de daño y reparación tisular (F. Di Virgilio, Adinolfi, 2017; Francesco Di Virgilio, 2005).

La adenosina extracelular actúa a través de los receptores purinérgicos P1, mientras que el ATP extracelular es censado por purinorreceptores P2, los cuales se dividen en 2 grandes familias: la familia de los receptores P2X que son trímeros que forman canales iónicos. Se han identificado 7 subunidades (P2X1-P2X7) y están ampliamente distribuidos en los tejidos tanto excitables como no excitables. Los receptores P2X están involucrados en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas en mamíferos, incluidos los seres humanos (Svennersten et al., 2015; Vulchanova et al., 1996; Worthington et al., 1999). La familia de receptores metabotrópicos P2Y acoplados a proteínas G con 7 motivos transmembranales (Geoffrey Burnstock, Williams, 2000; Sawynok, 2007; Vitiello et al., 2012). Se han reportado ocho subtipos en células de mamífero, dos de los cuales se activan de manera preferencial por ATP (P2Y2 y P2Y11) (Abbracchio et al., 2006) mientras que el resto (P2Y1, P2Y4, P2Y6, P2Y12, P2Y13 y P2Y14) son activados por ADP, UTP, UDP y UDP-glucosa (F. Di Virgilio, Adinolfi, 2017).

En condiciones patológicas, el ATP es liberado cuando las células inmunológicas se activan o las células del tejido sufren daños severos y actúa como una señal de peligro proinflamatoria (Idzko et al., 2014). En los macrófagos, la activación de los receptores purinérgicos P2X por efecto del ATP extracelular, causa un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular e induce la liberación de proteínas HMGB1 (del inglés, “high mobility group box 1”) e IL-1b (Kawano et al., 2012). Además, la unión del ATP a los receptores P2X también desencadena la activación del inflammasoma NLRP3 (del inglés, NLR “family pyrin domain containing 3”), el cual está conformado por múltiples proteínas intracelulares entre las cuales se incluyen la proteína NLRP3, la proteína adaptadora ASC (del inglés, “apoptosis-associated speck-like protein”) y una procaspasa-1, lo que da como resultado la maduración y liberación de la caspasa-1 además de la producción de IL-1b e IL-18 (Gombault et al., 2012; Jo et al., 2016; Rathinam, Fitzgerald, 2016; SuellenD’arc Santos Oliveira et al., 2014; Wewers, Sarkar, 2009).

2.4. Receptores P2X

Los receptores P2X son canales catiónicos que se abren en respuesta a la unión de ATP extracelular, se conocen 7 subunidades diferentes denominadas P2X1 al P2X7. Cada subunidad consta de dos dominios transmembranales denominados TM1 y TM2 unidos por un “loop” extracelular hidrofílico mientras que las terminaciones amino y carboxilo se sitúan en el espacio intracelular, su longitud varía entre 379 (P2X6) a 595 (P2X7) aminoácidos y son codificados por 7 genes diferentes (B S Khakh, 2001; R Alan North, 2002). Estas subunidades se ensamblan en grupos de tres para formar canales homo- o heterotriméricos funcionales, excepto P2X6 que solamente es funcional en su conformación heteromérica (R Alan North, 2002; Torres et al., 1999).

Cada receptor presenta propiedades biofísicas y farmacológicas diferentes que han sido descritas a lo largo de los años en diferentes especies (Coddou et al., 2011; R A North, Surprenant, 2000). Como se ha mencionado anteriormente, la unión de ATP al receptor P2X provoca la apertura de un canal. Estos cambios conformacionales permiten flujo de iones tales como sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) a través de la membrana. Cada receptor presenta características cinéticas y farmacológicas distintivas. Por ejemplo, los receptores P2X1 y P2X3 son sensibles a ATP con cinética de desensibilización rápida, mientras que los receptores P2X2 y P2X5 tienen una desensibilización lenta y el P2X7 no desensibiliza (R Alan North, 2002; Torres et al., 1999) (Figura 1).

La expresión heteróloga de la combinación de algunas subunidades resulta en canales con propiedades fisiológicas y farmacológicas distintas a las observadas en cada canal P2X expresado de manera individual. Por ejemplo, los receptores P2X2 expresados de manera individual no son activados por el análogo de ATP, α,β -meATP, y desensibilizan muy lento. Por su parte, los receptores P2X3 son activados por dicho análogo y desensibilizan rápidamente. Al combinar ambas subunidades se obtienen corrientes activadas por α,β -meATP cuya desensibilización es lenta (Lewis et al., 1995). De tal manera que las propiedades identificadas en los sistemas

heterólogos pueden ser extrapoladas para identificar la posible combinación de las subunidades que componen a los receptores P2X en células nativas (Evans et al., 1995; R Alan North, 2002). Además, a la fecha han sido reportadas múltiples variantes de cada subunidad que pueden variar entre especies, la mayoría de estas isoformas pierden uno o más exones durante el evento de “splicing” y presentan también cinéticas diferentes (Housley et al., 1995; Koshimizu, Tsujimoto, 2006; Liñan-Rico et al., 2012; Nicke et al., 2009; R Alan North, 2002).

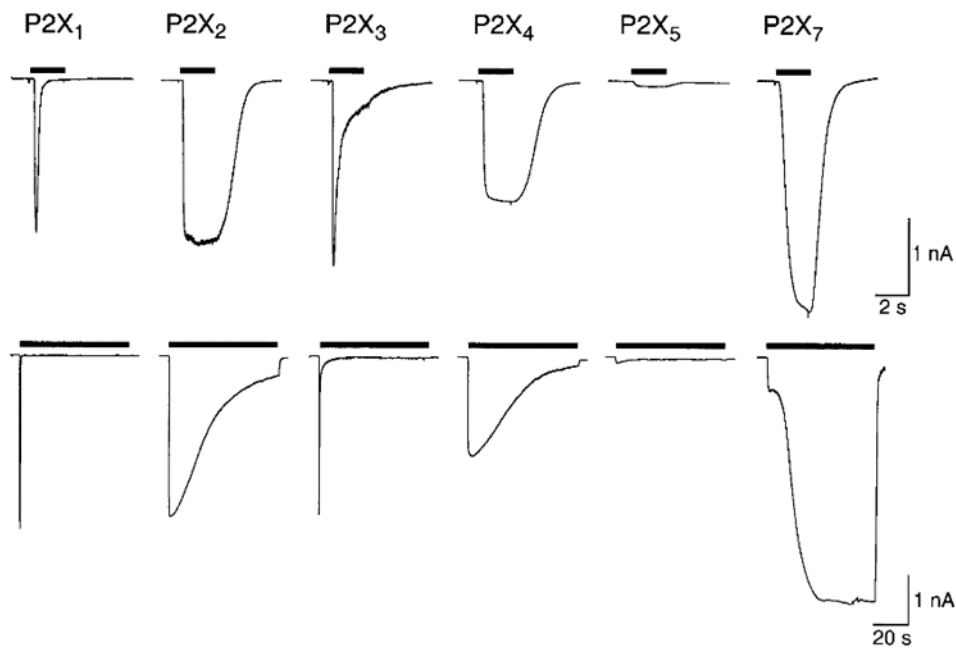


Figura 1. Cinéticas de los receptores P2X homoméricos inducidas por ATP extracelular. Registros de corrientes inducidas por 30 μM de ATP en diferentes receptores P2X de rata expresados en células HEK 293 obtenidos con la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa. Arriba, se muestran respuestas de los receptores P2X cuando se aplican 2 segundos de 30 μM de ATP, excepto P2X7 el cual requirió de 1 mM de ATP. Abajo, se muestra la desensibilización cuando se aplican 60 segundos de ATP. Se puede apreciar una desensibilización rápida en canales P2X1 y P2X3, una desensibilización más lenta en P2X2 y P2X4 y, por el contrario, el P2X7 no desensibiliza. Tomada de R Alan North 2002.

3. ANTECEDENTES

RECEPTORES P2X EN MACRÓFAGOS

Las células del sistema inmune expresan receptores purinérgicos, los cuales se han relacionado con sus funciones durante procesos inflamatorios y homeostáticos (Gabel, 2007; Trautmann, 2009). Mediante técnicas de inmunofluorescencia, Western blot y RT-PCR se demostró la expresión prominente de los receptores P2X4 y P2X7 en la línea celular J774 de macrófagos de ratón, mientras que la expresión de los receptores P2X1, P2X2, P2X3, P2X5 y P2X6 fue variable y en ocasiones débil o indetectable (Coutinho-Silva et al., 2005)

La presencia de los ARNm de P2X1, P2X3, P2X4, P2X5 y P2X7 también se ha encontrado en macrófagos alveolares de ratón, pero únicamente fueron capaces de demostrar la contribución de los receptores P2X4 y P2X7 en la función inmune pulmonar (Kessler et al., 2011). Por otro lado, en ratas, la expresión molecular y funcional del receptor P2X4 se ha observado en la línea celular NR8383 de macrófagos alveolares (Bowler et al., 2003) y células de Kupffer (Xiang et al., 2006). Mientras que, en macrófagos de humano se identificó la presencia de ARNm de P2X1, P2X4, P2X5 y P2X7 (J. A. Layhadi et al., 2018; Myrtek et al., 2008). A pesar de que la mayoría de artículos publicados se enfocan en las funciones del receptor P2X7, el cual parece estar incrementando durante la diferenciación de monocito a macrófago (L Gudipaty et al., 2001) y se asocia con múltiples funciones como son, la liberación de citocinas a través de la activación del inflammasoma (Gicquel et al., 2014), el proceso de fagocitosis y eliminación de microorganismos intracelulares mediante apoptosis (Lammas et al., 1997; Lees et al., 2010; Placido et al., 2006). El receptor P2X4 también se relaciona con la estimulación fagocítica en macrófagos alveolares humanos (Stokes, Surprenant, 2009) y recientemente se ha visto farmacológicamente la suma de la actividad fagocítica de los receptores P2X4 y P2X7 en el mismo grupo de células (Zumerle et al., 2019).

Por otra parte, la presencia del receptor P2X1 en macrófagos se ha relacionado con la facilitación de la entrada del virus VIH al macrófago (Hazleton et al., 2012). Recientemente, se demostró, por primera vez, la existencia de una

variante de edición del receptor P2X1 (P2X1del) en la mayoría de los monocitos humanos (88 %), la cual mostró poca sensibilidad al ATP, ya que solo se activa cuando se utilizó concentraciones altas de ATP (>1 mM). Además, también se demostró que la versión completa (canónica) del receptor P2X1 es capaz de responder a concentraciones bajas de ATP (>300 nM) mientras que concentraciones >1 mM generan corrientes con desensibilización bifásica que inicia con una rápida desensibilización que no regresa a su corriente inicial si no que presenta una corriente lenta que va incrementando con el tiempo de exposición a este nucleótido, igual a la corriente mediada por P2X1del (López-López et al., 2016). Estas corrientes son parecidas a las mediadas por el receptor P2X7 (R Alan North, 2002). Al respecto, varios estudios han considerado que los efectos del ATP en macrófagos y monocitos son mediados por los receptores P2X7 y por lo tanto han sugerido que están involucrados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas (Arulkumaran et al., 2011; Portales-Cervantes et al., 2010; D. F. Virgilio et al., 2017). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el uso de antagonistas específicos para los receptores P2X7 no son efectivos clínicamente (Arulkumaran et al., 2011; Keystone et al., 2012). Todas estas observaciones apoyan la hipótesis de que los efectos del ATP en macrófagos pudieran estar mediados por diferentes tipos de receptores P2X o por receptores heteroméricos formados por combinaciones, y no solo el receptor P2X7, como muchos autores sugieren.

4. JUSTIFICACION

Los receptores P2X están involucrados en procesos fisiológicos y fisiopatológicos del sistema inmunológico y su participación en la respuesta inflamatoria, nociceptiva y homeostática los convierte en posibles blancos terapéuticos para el control de enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas. Algunos estudios han caracterizado la población nativa de receptores P2X en macrófagos. Sin embargo, sus propiedades farmacológicas y sus funciones son poco conocidas y a la fecha son materia de debate científico. Por lo que surge el interés en estudiar la propiedades moleculares, farmacológicas y funcionales de

los receptores P2X nativos en macrófagos de humano, los cuales están involucrados en procesos inflamatorios y en la reparación tisular.

5. HIPOTESIS

Los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 contribuyen a las corrientes iónicas activadas por ATP en macrófagos de humano.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y electrofisiológicamente la expresión de los receptores P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 en macrófagos derivados de monocitos periféricos humanos.

6.1. Objetivos específicos

- a) Examinar la expresión y co-expresión de los ARNm de las subunidades P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 en macrófagos derivados de monocitos humanos mediante la técnica de PCR de célula única
- b) Caracterizar la respuesta de activación y desensibilización de los receptores P2X nativos de los macrófagos de humano con concentraciones bajas y altas de ATP mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa.
- c) Caracterizar la respuesta farmacológica de los receptores P2X nativos de los macrófagos de humano con el uso de distintos antagonistas y moduladores.
- d) Comparar las respuestas P2X nativas de macrófagos de humano con las respuestas mediadas por el receptor P2X1 homomérico humano recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y diferenciación a macrófagos derivados de monocitos (MDM)

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa de personas voluntarias sanas, de sexo indistinto entre 21 y 35 años, la cual fue diluida a una concentración 1:1 en buffer de fosfatos (PBS) y se realizó la separación por gradiente de ficoll siguiendo las instrucciones del proveedor (ficoll-hytopaque de Sigma, St Louis, MO). Los PBMC (del inglés; "peripheral blood mononuclear cell") obtenidos fueron resuspendidos en medio RPMI-1640 (Gibco, Ciudad de México, Mx) y se colocaron a una densidad de 1×10^6 células por ml en placas de cultivo de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio circulares de 12 mm (Bellco Glass, Inc.) previamente esterilizados y desengrasados. Dos horas después se retiraron las células no adheridas mediante un lavado con PBS y se dejaron en medio RPMI-1640 adicionado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (FBS, por sus siglas del inglés "Fetal Bovine Serum"), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina, 60 ng/ml del factor estimulante GM-CSF (Gibco, Ciudad de México, Mx) y se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera del 5 % de CO₂ por 7 días para su diferenciación a macrófagos. El 50 % del medio fue reemplazado por medio fresco enriquecido cada 3 días.

7.2. RT-PCR de célula única

Los macrófagos fueron seleccionados por sus propiedades de adherencia y características morfológicas bajo el microscopio. Los macrófagos individuales fueron cosechados mediante la aplicación de una ligera succión dentro de una micropipeta de cristal conteniendo 6 µl de mix RT libre de RNAsas (5x iScript mix de reacción 1.2 µl, iScript transcriptasa reversa 0.5 µl, H₂O libre de nucleasas 4.3 µl). Posteriormente, el contenido de la pipeta fue depositado en un tubo de PCR con 12 µl de mix de reacción (5x iScript mix de reacción 2.8 µl, iScript transcriptasa reversa, 0.1 % Tritón X-100 1 µl, y 8.2 µl agua libre de nucleasas). La reacción se incubó a 25 °C por 5 minutos, 46 °C por 20 minutos y 1 minuto a 95 °C y almacenada a -20 °C hasta su uso. Como control negativo se recolectó fluido de la vecindad de las células. La expresión de ARNm de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

(GAPDH) fue utilizado como control de carga de ARNm para cada célula. La reacción de PCR contenía: 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 0.2 mM de primers (tabla 1 en anexo A), 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Life Technologies, Texas, USA), y 1x de buffer de PCR ajustado con agua libre de nucleasas (DEPC; del inglés Diethyl pyrocarbonate) a un volumen final de 25 µl. Para la primera reacción se emplearon 5 µl de cDNA muestra y para las reacciones anidadas se usó 1 µl de la PCR anterior en todos los casos. Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador T100 (Biorad). En todos los casos se usaron condiciones estándar; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización 95 °C por 30 segundos, alineamiento 30 segundos, extensión a 72 °C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C, únicamente se modificó la temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión en cada una de las reacciones (tabla 1, anexo A). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y teñido con bromuro de etidio (0.0005 mg/ml). El tamaño de cada amplicón fue obtenido por el análisis de los oligos con la herramienta primer-blast del NCBI tomando los resultados de las secuencias correspondientes a cada gen como el tamaño esperado y fueron secuenciados para confirmar su identidad con el secuenciador AB 3130 (Applied Biosystems) en el Laboratorio Nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental (LANBAMA) del IPICYT (San Luis Potosí, SLP., México).

7.3. Registros electrofisiológicos por la técnica de patch-clamp

Las IATP se registraron usando la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa con el amplificador Axopatch 200B digitalizado por el convertidor AD Digidata 1322A, guardado y analizado con el programa pClamp 9.2 (Axon Instruments, California, USA). Los MDM se colocaron en la cámara de registro con una perfusión constante de aproximadamente 2ml/min con solución externa. La solución externa contenía (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. La resistencia de las pipetas fue entre 2-5 MΩ y se fabricaron usando capilares de vidrio con filamento 1B200F-6 (World Precision Instruments, Inc.) y el estirador y pulidor de pipetas PP-830 y MF-83 (Narishige, Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan),

respectivamente. La solución interna contenía (en mM): CsCl, 140; NaCl, 5.5; EGTA, 10; HEPES, 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. Cambios rápidos en la solución externa fueron realizados utilizando un dispositivo de ocho tubos, estos tubos estaban conectados a jeringas que contenían las soluciones control (solución externa) y experimental (solución externa más el fármaco o fármacos experimentales). El tubo que contenía la solución control fue colocado abierto en frente de la célula por registrar y una aplicación externa de la solución experimental fue realizada por el cambio rápido del tubo control por el tubo que contenía la solución experimental, el cual ya drenaba la solución que contenía. Los tubos se movieron usando un micromanipulador (WR-88; Narishige Scientific Instrument Lab, Tokyo Japan). Las sustancias experimentales fueron removidas por el regreso a la solución control. La solución externa fue liberada por gravedad y el nivel de la jeringa se ajustó continuamente para minimizar los cambios en la velocidad de flujo. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (~23 °C).

7.4. Expresión heteróloga del receptor P2X1 humano en Oocitos de *Xenopus Laevis*

Para aislar la subunidad P2X1 se realizó una PCR usando Platinum Pfx Taq DNA Polimerasa (Life Technologies, Texas, USA), como se describió previamente (López-López et al., 2016). Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Wisconsin, USA) y se subclonaron en el vector pCDNA3. Esta construcción se usó para transformar bacterias de *Escherichia coli* TOP 10 calcio competentes por choque térmico, se seleccionaron las colonias y se realizó la extracción del plásmido por lisis alcalina, el DNA fue linealizado con la enzima *Xba* I (Biolabs™) a 37 °C durante toda la noche, se purificó y se cuantificó en NanoDrop™ 2000. Para la síntesis de ARNm *in vitro* se empleó el kit mMessage mMachine T7 (Life Technologies, Texas, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El ARNm obtenido se resuspendió en 2 µl de agua libre de RNAsas y almacenó a -70 °C hasta su inyección en los ovocitos. Los ovocitos se obtuvieron de ranas de la especie *Xenopus laevis*, las cuales fueron anestesiadas con 10 mM Tricaina (3-aminobenzoico etil éster metasulfonato) y los ovocitos fueron removidos por

disección. Únicamente, se seleccionaron ovocitos en etapa IV o V, los cuales fueron defoliculados manualmente, y colocados en solución de Barth (88 mM NaCl, 0.33 mM Ca (NO₃)₂, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃ y 10 mM HEPES y se ajustó el pH 7.2-7.4 con 5 M NaOH). Los ovocitos fueron inyectados con un microinyector Nanoliter 2000 (Word Precision Instrument) a una concentración de 400 ng/μl aproximadamente e incubados a 14 °C por 12-24 h antes de los experimentos electrofisiológicos. Los registros se hicieron con la técnica de fijación de voltaje de 2 electrodos (TEVC). Usando un amplificador Axoclamp 2B (Axon instruments) conectado a un convertidor AD MiniDigi 1A y almacenados con el programa AXOSCOPE 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los ovocitos fueron puestos en la hendidura de la cámara de registro y con la ayuda de los micromanipuladores (WR-88, Narishigue Scientific Instrument Lab, Tokyo Japón), se pinzó entre 2 micropipetas de vidrio con una resistencia entre 0.3 y 0.8 Ω, estiradas y pulidas con el pulidor Flaming/Brown P-87 y llenadas con solución interna (2 M KCl, 10 Mm EGTA, pH 7.8). La cámara de registro contó con perfusión constante de aproximadamente 3 ml/min con solución externa (88 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES pH 7.4). Las corrientes fueron registradas con un potencial de membrana de -60 mV. La aplicación de ATP se hizo con un dispositivo de 8 tubos (1.6 mm de diámetro), entre cada estimulación se hizo un lavado de 5 min con solución externa. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~23 °C). Los tubos se movieron manualmente con un manipulador Narishigue (MMN-3).

7.5. Soluciones y reactivos

El medio RPMI-1640, FBS, and GM-CSF fueron adquiridos en Gibco (Carlsbad, CA). El ATP, A-804598 (antagonista competitivo y selectivo de los receptores P2X₇), ivermectina (modulador alostérico positivo de los receptores P2X₄), PPADS (Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico) y suramina (ambos son antagonistas no selectivos de los receptores P2X, dimetilsulfóxido (DMSO), L-glutamina, penicilina, estreptomocina y otras sales se compraron de Sigma-Aldrich (Toluca, MX). La solución stock de ATP (100 mM) se preparó en solución externa el mismo día de su uso. El stock de cada fármaco (0.01-1 M) fue

hecha usando agua destilada y desionizada excepto para la ivermectina y el A-804598, las cuales se prepararon en DMSO (concentración final: 0.05%). En estos casos el experimento control se llevó a cabo usando la misma concentración de DMSO sin los fármacos. Para su aplicación, todos los fármacos fueron diluidos en solución externa a la concentración requerida. Los antagonistas e ivermectina fueron aplicados 3 minutos antes de que se aplicará ATP junto con el antagonista, a menos que otra cosa se mencione.

7.6. Análisis de datos

En todos los experimentos los valores son presentados como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). El número de experimentos se designa como “n”. Células de al menos 5 voluntarios diferentes fueron usados para cada experimento. La curva concentración respuesta fueron ajustadas a una función logística en el programa Prism 7.0 (Graphpad, La Jolla, CA, USA). Las Corrientes obtenidas fueron normalizadas considerando la amplitud de la respuesta a 0.1 mM de ATP como el 100% en cada célula. Los datos se analizaron con la prueba de t de Student pareada para obtener la diferencia entre los grupos de datos de las células probadas. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando $p \leq 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. El ARNm de las subunidades P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 se expresan en los macrófagos de humano

Se llevó a cabo la técnica de RT-PCR de célula única usando oligonucleótidos específicos (tabla 1) para determinar si las subunidades P2X1, P2X1del, P2X4 y P2X7 se co-expresan en un mismo macrófago. La identidad de los productos de PCR se confirmó por secuenciación. El 91 % de los macrófagos positivos a GAPDH expresaron P2X (20 de 22 células de 5 voluntarios saludables) de estos el 5 % expreso la variante de “splicing” P2X1del (1 de 20 células), 40 % P2X1 (8 de 20 células), 20 % P2X4 (4 de 20 células) y 90 % el P2X7 (18 de 20 células) (figura 2 A y B). Además, de todos los macrófagos que expresaron P2X, el 25 % co-expresaron P2X7 y P2X1, el 5 % co-expresaron el ARNm de las subunidades P2X7 y P2X4 y el 15 % co-expresó P2X7, P2X4 y P2X1 en la misma célula (figura 2 A y C).

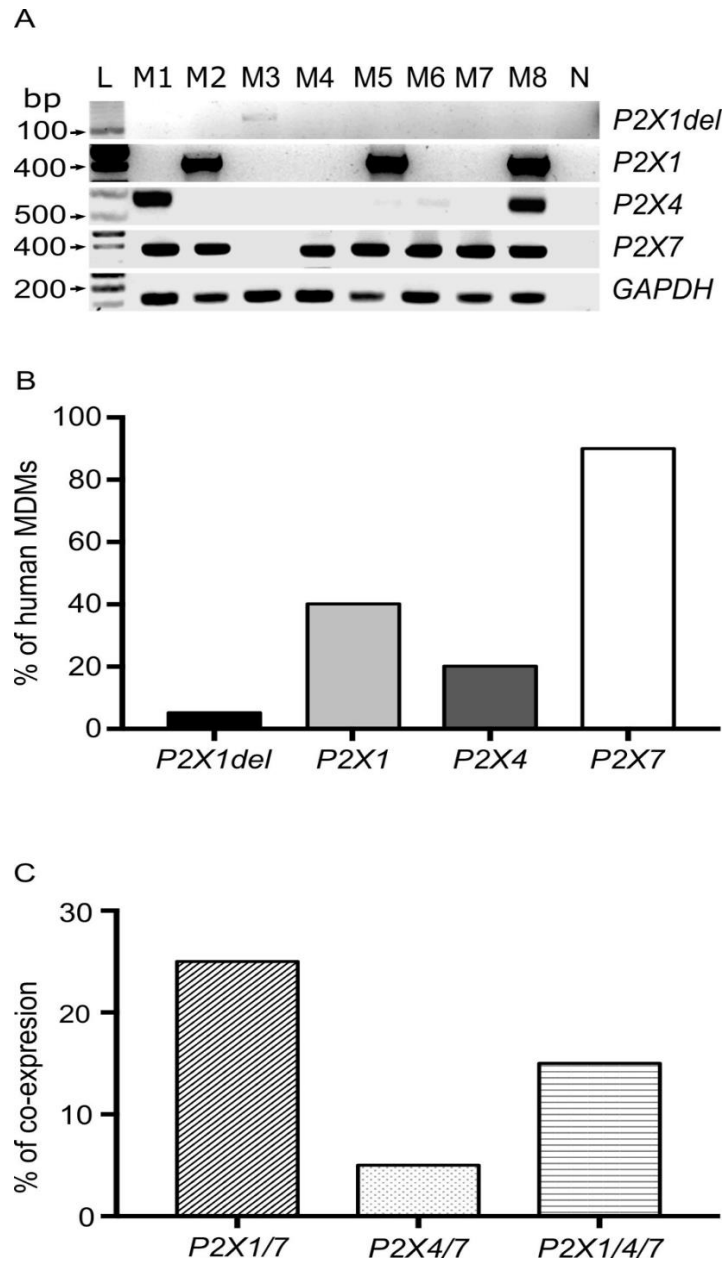


Figura. 2. Expresión de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en macrófagos de humano. A) Gel representativo de los productos de PCR de 8 macrófagos individuales. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los RT-PCR en célula única. Productos de PCR de 197 pb, 402 pb, 543 pb, 375 pb y 118 pb correspondientes a los ARNm de las subunidades P2X1del, P2X1, P2X4, P2X7 y GAPDH, respectivamente. L; escalera de ADN, M1-M8; macrófagos del 1 al 8, N; control negativo (no se amplificaron transcripciones del fluido del baño). El macrófago 1 (M1) co-expresó ARNm de P2X4 y P2X7, los macrófagos 2 y 5 (M2 y M5) co-expresaron ARNm de P2X1 y P2X7, el macrófago 3 (M3) expresó ARNm de P2X1del, los macrófagos 6 y 7 (M6 y M7) expresaron ARNm de P2X7 y el macrófago 8 (M8) co-expresó ARNm de P2X1, P2X4 y P2X7. **B)** Porcentaje de macrófagos que expresan los transcritos de P2X1del, P2X1, P2X4 y P2X7 en 20 células GAPDH positivas probadas. **C)** Porcentaje de macrófagos que co-expresan los transcritos de las subunidades P2X1 / P2X7, P2X4 / P2X7 y P2X1 / P2X4 / P2X7.

8.2. Una concentración baja de ATP indujo dos tipos diferentes de corrientes en macrófagos de humano

Para determinar el efecto inmediato de una concentración baja de ATP en los receptores P2X nativos, se llevaron a cabo experimentos de patch-clamp en su configuración de célula completa en macrófagos de humano cultivados. La aplicación breve (5 s) de ATP 0.01 mM provocó una corriente entrante rápida en aproximadamente el 42 % de los macrófagos registrados (76 de 181). El pico de corriente se alcanzó en menos de un segundo y la amplitud media de este pico fue de 281.7 ± 54.1 pA. En presencia de ATP, identificamos dos velocidades de desensibilización diferentes en las respuestas celulares. La primera fue una respuesta de desensibilización rápida (Figura 3A) que fue ajustada por la suma de dos funciones exponenciales, un componente rápido inicial ($\tau_1 = 0.23 \pm 0.40$ s) seguido de un componente prolongado ($\tau_2 = 2.30 \pm 0.53$ s; $n = 19$; Figura 2B), observado en aproximadamente el 68 % de los macrófagos de humano analizados (19 de 28). La segunda respuesta de desensibilización inducida por la aplicación constante de ATP 0.01 mM fue lenta (Figura 3C), y se ajustó a una sola exponencial ($\tau = 6.63 \pm 2.32$ s; Figura 2D). Esta respuesta se observó en las células restantes analizadas (~32 %) (9 de 28). Para determinar si la aplicación repetida de ATP conduce a una desensibilización dependiente del tiempo, se añadió una concentración baja de ATP (0.01 mM) varias veces después de un intervalo de 5 min libre de ATP. En las células de desensibilización rápida, después de 5 min, la corriente observada fue ~ 50 % de su valor a la primera aplicación (primera $I_{ATP} = 321.9 \pm 74.4$ pA frente a la segunda $I_{ATP} = 165.3 \pm 45.1$ pA, $n = 19$, Figura 3E). En la cuarta aplicación consecutiva de ATP, es decir después de 15 min, la corriente se desensibilizó casi por completo, dejando solo ~ 25 % de la corriente residual (88.2 ± 32.2 pA) en 19 de 28 macrófagos de humano (Figura 3E). Contrario a lo descrito anteriormente, en las células que mostraron una desensibilización lenta, las aplicaciones repetidas de ATP 0.01 mM por 5 s condujeron a un incremento progresivo de la corriente sostenida en un 143 % en 15 min (primer $I_{ATP} = 241.5 \pm 77$ pA vs cuarto $I_{ATP} = 345 \pm 100$ pA; $n = 9$; Figura 3F).

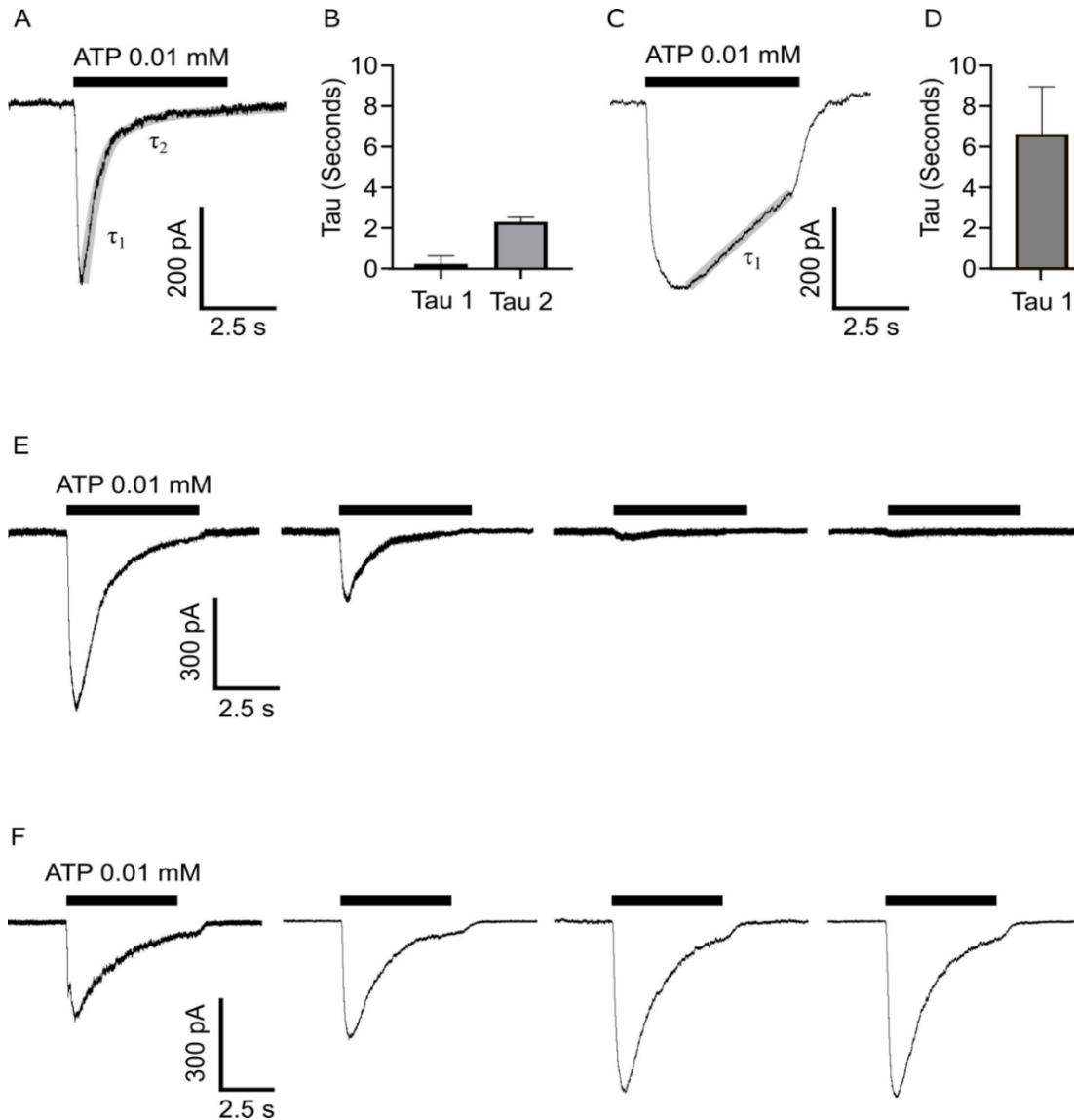


Figura 3. Respuestas P2X activadas por baja concentración de ATP en macrófagos de humano. A) Trazo representativo de una corriente entrante de desensibilización rápida inducida por ATP 0.01 mM de un macrófago humano. Note la pérdida completa de corriente aún en la presencia de ATP. B) La respuesta de desensibilización rápida se ajustó a la suma de dos funciones exponenciales ($n = 19$ células). C) Trazo representativo de una corriente desensibilizante lenta inducida por ATP 0.01 mM de un macrófago humano. D) La respuesta de desensibilización lenta se ajustó bien a una función exponencial ($n = 9$ células). E) Corriente entrante de desensibilización rápida (como en A) después de aplicaciones repetidas de ATP (0.01 mM) administradas al mismo macrófago con intervalos de 5 minutos. La segunda respuesta al agonista se atenuó significativamente en comparación con la primera. F) Corrientes de desensibilización lenta (como en B) activadas por la aplicación de 5 s de ATP 0.01 mM con intervalos de 5 minutos de otro macrófago humano. Las aplicaciones repetidas de ATP 0.01 mM conducen al aumento progresivo de la corriente sostenida. El tiempo de aplicación de ATP se indica mediante barras negras arriba de los registros. Los gráficos de barras representan el promedio de t , y las líneas en la parte superior representan el S.E.M.

8.3. Concentraciones altas de ATP inducen tres respuestas diferentes en los macrófagos de humano

La estimulación de los macrófagos de humano con una alta concentración de ATP (5 mM) mostraron respuestas con diferentes cinéticas de desensibilización. El 69 % de los macrófagos estudiados (31 de 45; Figura 4B) mostraron una respuesta lenta, caracterizada por una activación relativamente lenta que no desensibiliza (Figura 4A, trazo izquierdo), mientras que, el 15 % de los macrófagos (7 de 45; Figura 4B) mostraron una corriente transitoria rápida con activación y desensibilización rápida (Figura 4A, trazo intermedio), y el 15 % restante (7 de 45; Figura 4B) presentaron una corriente bifásica, que consistió en una activación y desensibilización rápida seguida por una corriente no desensibilizante que se va incrementando en presencia de ATP (Figura 4A, trazo derecho). Aplicaciones múltiples de ATP 5 mM durante 5 segundos a intervalos de 5 minutos mostraron la pérdida gradual del componente rápido, pero no del componente no desensibilizante, el cual permanece e incrementa durante el tiempo de aplicación de ATP (Figura 4 C).

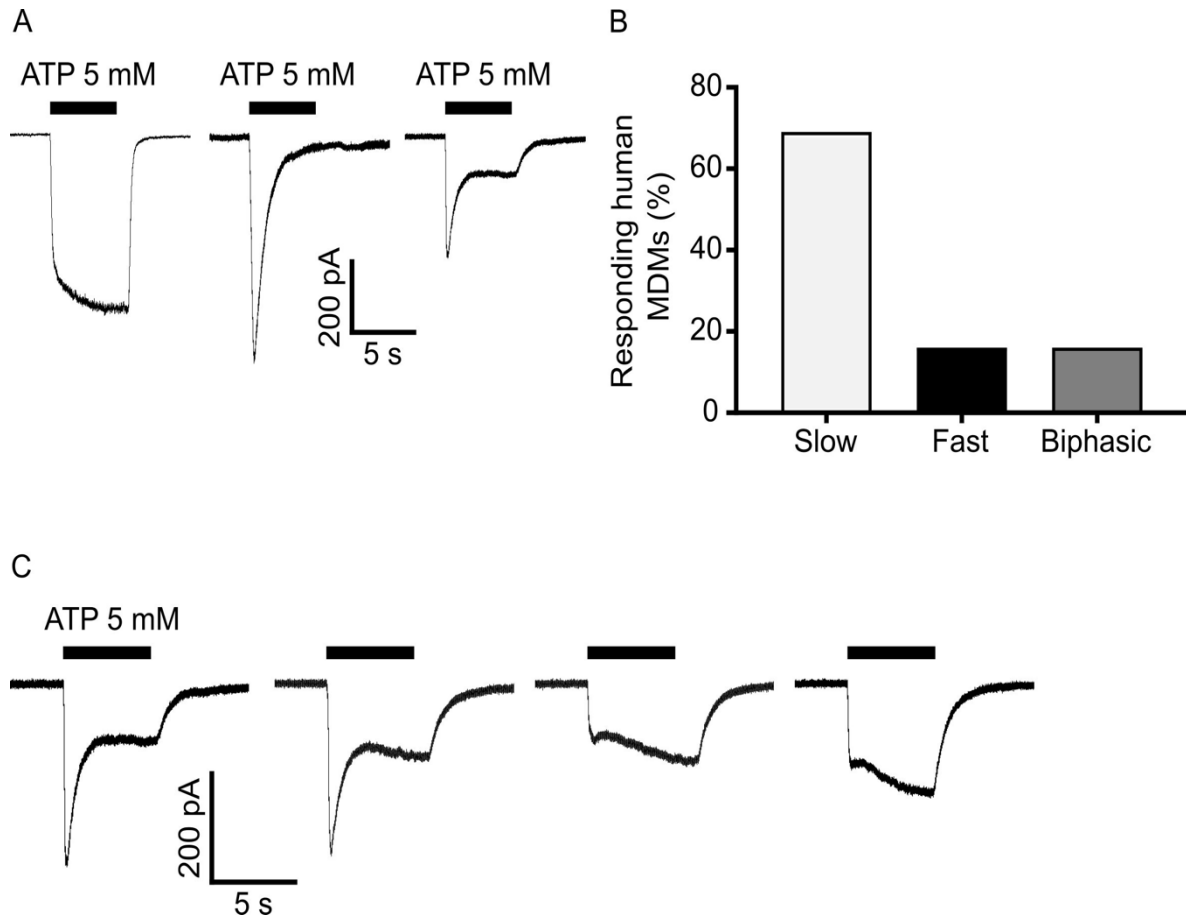


Figura 4: Respuestas obtenidas al aplicar una alta concentración de ATP en macrófagos de humano. A) Corrientes generadas por la aplicación de 5 mM de ATP en tres macrófagos diferentes con cinéticas distintas: la primera con una cinética de activación lenta y no desensibilizante (trazo izquierdo; n = 31) la segunda con una cinética de activación y desensibilización rápida (trazo intermedio; n = 7) y la tercera con un cinética de desensibilización bifásica (trazo derecho; n = 7) con activación y desensibilización rápida que no regresa por completo a la corriente basal y presenta una fase no desensibilizante. B) Porcentaje de macrófagos que mostraron las distintas cinéticas de las respuestas generadas por la aplicación de 5mM de ATP. C) Registro representativo de un macrófago con una cinética bifásica expuesto a múltiples aplicaciones de ATP 5 mM con intervalos de lavado de 5 min. Se puede ver la pérdida de la fase rápida y un incremento en la fase no desensibilizante.

8.4. Efectos del PPADS sobre las I_{ATP} en macrófagos de humano

Para estudiar el efecto de PPADS, se usaron células cuya desensibilización a la segunda aplicación de 0.01 mM de ATP fue menor al 20 %. Se aplicó el PPADS 4 min antes de aplicar ATP. PPADS (1 μ M) inhibió las corrientes de desensibilización rápida inducidas por ATP 0.01 mM en macrófagos de humano. (n = 4; Figura 5 A). Esta inhibición fue de ~ 35 % del valor del control ($I_{ATP} = 362.6 \pm 91.3$ pA contra $I_{ATP + PPADS} = 235.1 \pm 82.3$ pA, n = 4; p = 0.017; Figura 5 C). El efecto de PPADS persistió por más de 20 minutos, razón por la cual tras cada exposición a PPADS el cubreobjetos fue cambiado, incluso con experimentos fallidos. Los macrófagos que mostraron cinéticas de desensibilización lenta con concentraciones bajas de ATP fueron insensibles a la concentración de PPADS utilizada (n = 4; Figura 6B).

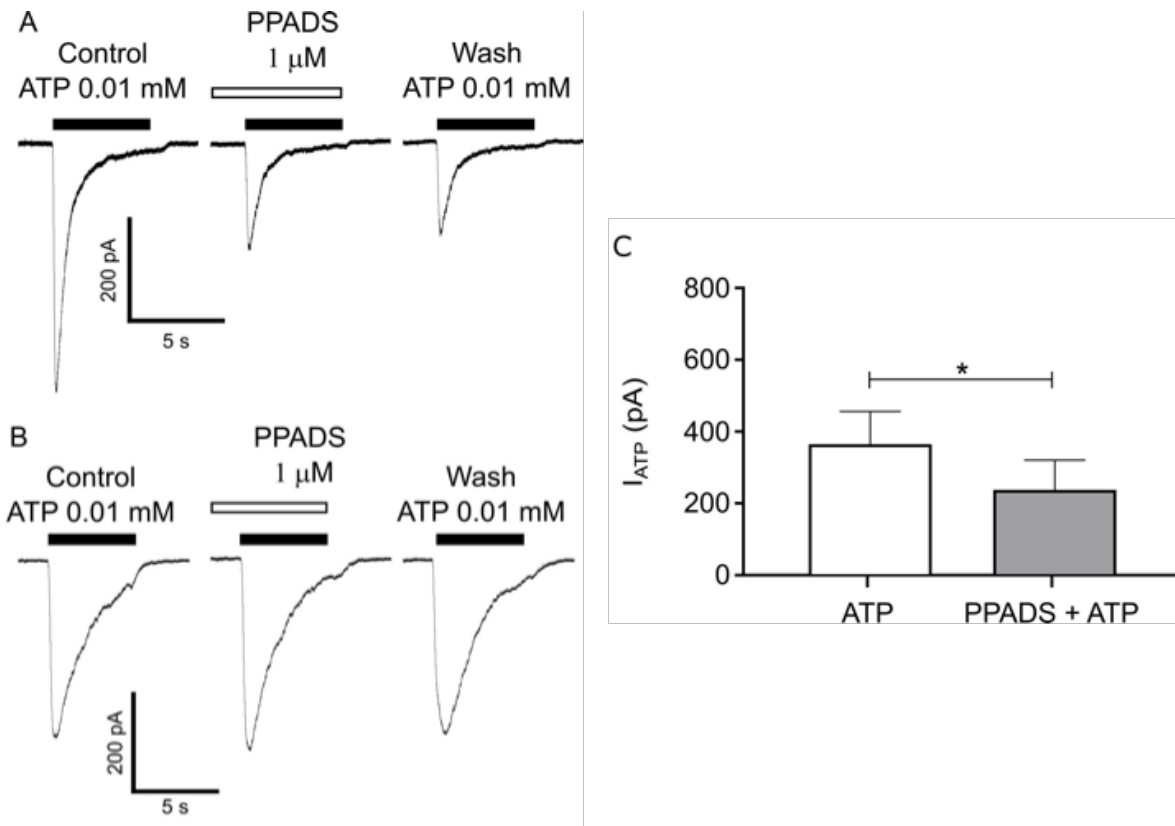


Figura 5: PPADS inhibe las corrientes de desensibilización rápida inducidas por ATP 0.01 mM en macrófagos de humano. A) Corriente representativa de una respuesta rápida inducida por ATP (0.01 mM) antes, durante y 5 min después de la aplicación de PPADS (1 mM) en el mismo macrófago. Después de 4 min de incubación, el PPADS inhibió las I_{ATP} . B) Corriente representativa de una respuesta de desensibilización lenta inducida por ATP (0.01 mM) antes, durante y 5 min después de la aplicación de PPADS (1 mM) en otro macrófago. PPADS no tiene efecto sobre las corrientes de desensibilización lenta. PPADS se aplicó 4 min antes de aplicar el ATP. Las barras horizontales arriba de los registros indican la duración de la aplicación del agonista y antagonista. C) Comparación del promedio de la I_{ATP} 0.01 mM en ausencia (barra blanca) y en presencia (barra gris) de PPADS. Las líneas arriba de las columnas representan el S.E.M. El efecto inhibitorio del PPADS fue estadísticamente significativo de su valor control ($n = 4$; * $p < 0.05$; prueba t-Student pareada).

8.5. Efecto de la ivermectina sobre los receptores P2X nativos en macrófagos de humano

Para investigar la contribución del receptor P2X4 en los macrófagos de humano, se usó ivermectina como un modulador alostérico positivo selectivo al receptor P2X4. La pre-incubación de los macrófagos durante 3 min con ivermectina (3 μM) potenció significativamente las I_{ATP} (0.01 mM) en el 57 % de los macrófagos

registrados (4 de 7; Figura 6A), siendo la corriente 1.5 veces más grande que las corrientes control (sin ivermectina) ($I_{ATP} = 344.4 \pm 175.4$ pA vs $I_{ATP + ivermectina} = 529.8 \pm 148.7$ pA,; $n = 7$; $p = 0.03$; Figura 6B).

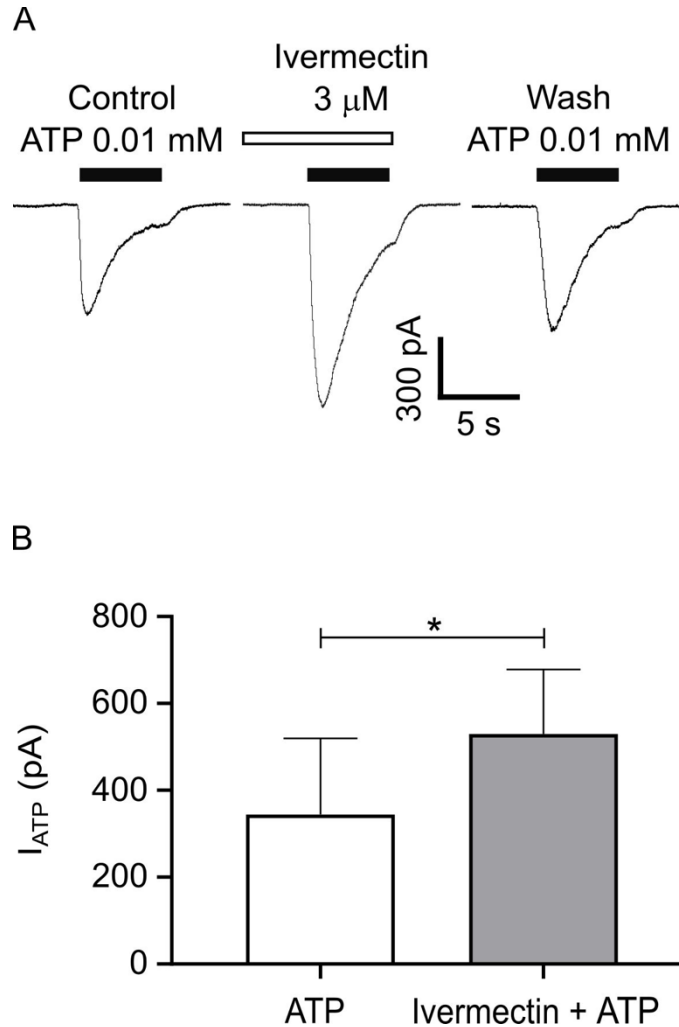


Figura 6: La ivermectina potenció las corrientes de desensibilización lenta inducidas por ATP 0.01 mM en macrófagos de humano. A) Corriente representativa de desensibilización lenta inducida por ATP 0.01 mM, antes, durante y 5 min después de la aplicación de ivermectina (3 μM). La ivermectina fue aplicada 3 min antes de aplicar el ATP. Las barras horizontales arriba de los registros indican la duración de la aplicación del agonista y el modulador. B) La grafica de barras representa el promedio de las I_{ATP} en ausencia (barra blanca) y presencia (barra gris) de ivermectina las líneas verticales representan el S.E.M. El efecto potenciador de la ivermectina sobre las I_{ATP} fue estadísticamente significativo en comparación con los valores control (sin ivermectina) ($n = 7$; $*p < 0.05$; prueba t-Student pareada).

8.6. Efecto del antagonista A-804598 sobre los receptores P2X7 nativos de macrófagos de humano

Para evaluar la participación funcional del receptor P2X7 en macrófagos se aplicó una concentración alta de ATP (5 mM) y un antagonista selectivo de los receptores P2X7, denominado A-804598. La pre-aplicación de A-804598 (0.1 μ M) durante un minuto inhibió significativamente las I_{ATP} (Figura 7A), con una disminución en el promedio de la corriente de ~ 62 %. ($I_{ATP} = 263.8 \pm 104$ pA vs $I_{ATP} + A-804598 = 101.4 \pm 66$ pA, $n = 7$; $p < 0.05$; Figura 7C) en el 67 % de los macrófagos de humano registrados (4 de 6). Mientras, que el 33 % de los macrófagos que exhibieron cinéticas rápidas o bifásicas en presencia de ATP 5 mM no fueron afectadas por el antagonista A-804598. (Figura 7B)

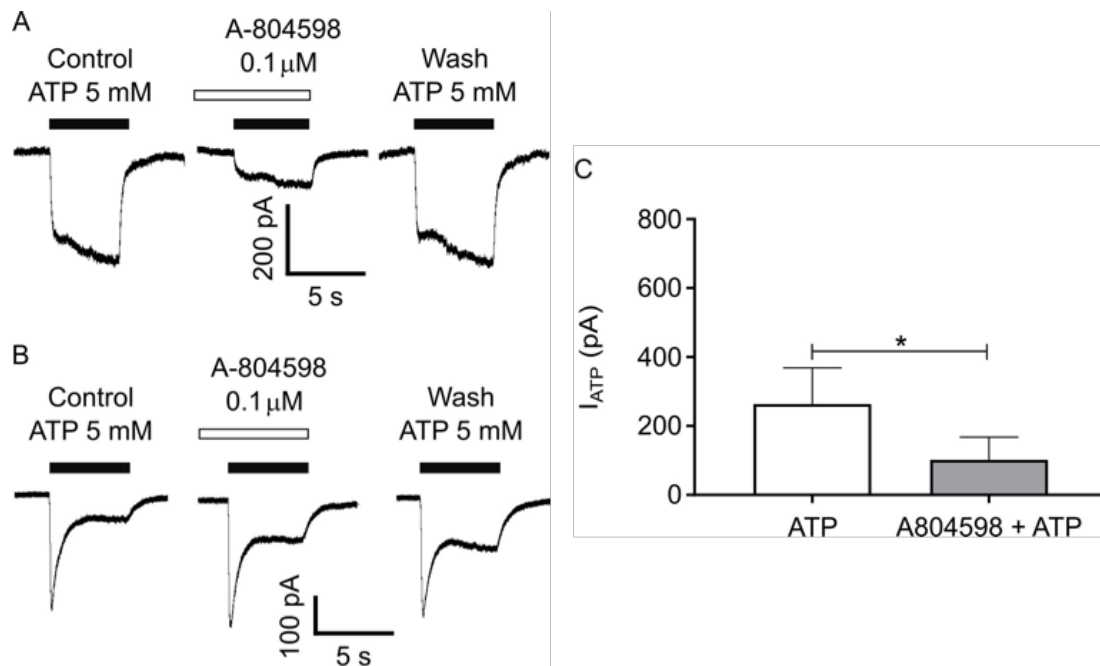


Figura 7: El antagonista A-804598 inhibió las corrientes no desensibilizantes inducidas por 5 mM de ATP, sin afectar las corrientes bifásicas en macrófagos de humano. A) Registros representativos de un macrófago que mostró una corriente de activación lenta y no desensibilizante inducida por la aplicación de ATP 5 mM, antes, durante y 5 min después de la aplicación de A-804598 (0.1 mM). El A-804598 inhibió la corriente en macrófagos de humano. El A-804598 fue aplicado un minuto antes de la aplicación de ATP. B) El A-804598 (0.1 μ M) no tuvo efecto sobre las corrientes bifásicas inducidas por ATP 5 mM. Las barras horizontales en la parte superior de los registros indican la duración de la aplicación de los fármacos. C) La gráfica de barras representa el promedio de la I_{ATP} en ausencia (barra blanca) y presencia (barra gris) del antagonista A-804598 sobre las corrientes no desensibilizantes. El efecto inhibitorio del A-804598 fue estadísticamente significativo ($n = 6$; * $p < 0.05$; prueba t-Student pareada).

8.7. Comparación de la respuesta de ATP en macrófagos de humano con la respuesta P2X1 de humano recombinante

Debido a que las respuestas P2X en macrófagos de humano exhibieron propiedades similares a las reportadas para el receptor P2X1 homomérico de monocitos de humano (López-López et al., 2016) y a los resultados de RT-PCR de célula única, las respuestas P2X nativas de MDM de humano fueron comparadas con la respuesta del P2X1 de humano homomérico recombinante expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. El receptor P2X1 de humano recombinante exhibió una cinética de respuesta de ATP (0.01 y 5 mM) similar a la respuesta P2X rápida y bifásica observadas en MDM de humano (Figura 8A). Además, las curvas concentración-respuesta de ATP (0.003 - 1 mM) en macrófagos de humano y ovocitos exhibieron valores EC_{50} de ATP muy similares (2.7 ± 0.5 mM; $n = 5-12$ y 2.5 ± 2.0 mM; $n = 5-17$ para el receptor hP2X1 recombinante y los macrófagos de humano, respectivamente; Figura 8B y C).

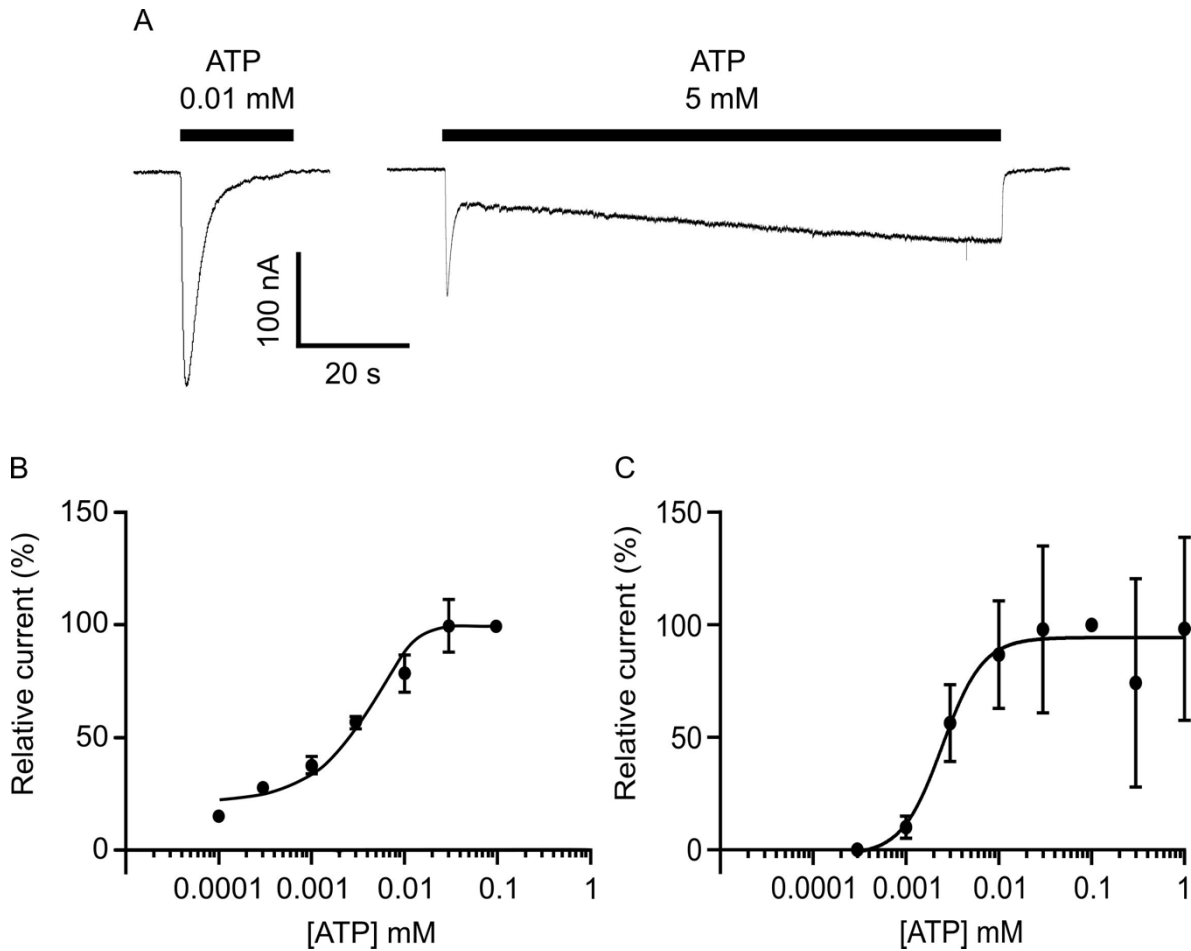


Figura 8. Las propiedades de las corrientes mediadas por el receptor P2X1 homomérico de humano expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* se asemejan a las observadas para los receptores P2X nativos en macrófagos de humano. A) Registros representativos de las I_{ATP} registradas en ovocitos expresando el receptor P2X1 homomérico de humano. Note que a una concentración baja de ATP (0.01 mM; trazo izquierdo) la corriente muestra una cinética de desensibilización rápida, que vuelve a la basal incluso en presencia de ATP. A mayor concentración de ATP (5 mM; trazo derecho), la amplitud de la corriente del receptor P2X1 homomérico continuó aumentando después de un componente inicial de desensibilización rápida durante la aplicación sostenida de ATP (~ 1 min). El potencial de membrana de los ovocitos se fijó a -60 mV. El tiempo de aplicación de ATP se indica mediante barras horizontales negras arriba de los registros. B) Curva concentración-respuesta de ATP (0.0001-0.1 mM) del receptor P2X1 de humano homomérico expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* ($EC_{50} = 2.7 \pm 0.5$ mM; $n = 5-12$ ovocitos). C) Curva concentración-respuesta de ATP (0.0003 - 1 mM) de los receptores P2X nativos en macrófagos de humano ($EC_{50} = 2.5 \pm 2.0$ mM; $n = 5-17$). En ambos gráficos, los símbolos representan las medias y las líneas verticales son S.E.M. de la corriente relativa (%). Las respuestas se normalizaron con respecto a las observadas con ATP 0.1 mM en cada ovocito o macrófago. Las curvas sigmoidales son el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros.

8.8. Efectos de la suramina sobre las I_{ATP} 0.001 mM en macrófagos y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano

Diferentes concentraciones de suramina se aplicaron para caracterizar la respuesta de los receptores P2X nativos en macrófagos de humano y los receptores P2X1 de humano expresados en ovocito de *Xenopus laevis*. La suramina se aplicó por 3 min antes de la aplicación de ATP. En el presente estudio, se encontró que el efecto de la suramina sobre las I_{ATP} 0.01 mM es diferente a concentraciones bajas y altas. De este modo, la suramina a una concentración de 0.1 μ M inhibió las I_{ATP} en todos los macrófagos de humano registrados (n = 6; Figura 9A). Sin embargo, a concentraciones más altas de suramina (30 μ M) se observó un efecto potenciador sobre las I_{ATP} en el 82 % de los macrófagos registrados (n= 6; Figura 9B), mientras que, en el 18 % restante la suramina produjo un efecto inhibitorio sobre las I_{ATP} . En contraste, los ovocitos con expresión heteróloga de los receptores P2X1 de humano exhibieron una potenciación de las I_{ATP} 0.01 mM con la aplicación de suramina 0.1 μ M (n = 6; Figura 9C), mientras que, a concentraciones más altas de suramina (30 μ M) se observó un efecto inhibitorio sobre las I_{ATP} en todos los ovocitos registrados (n = 8; Figura 9D).

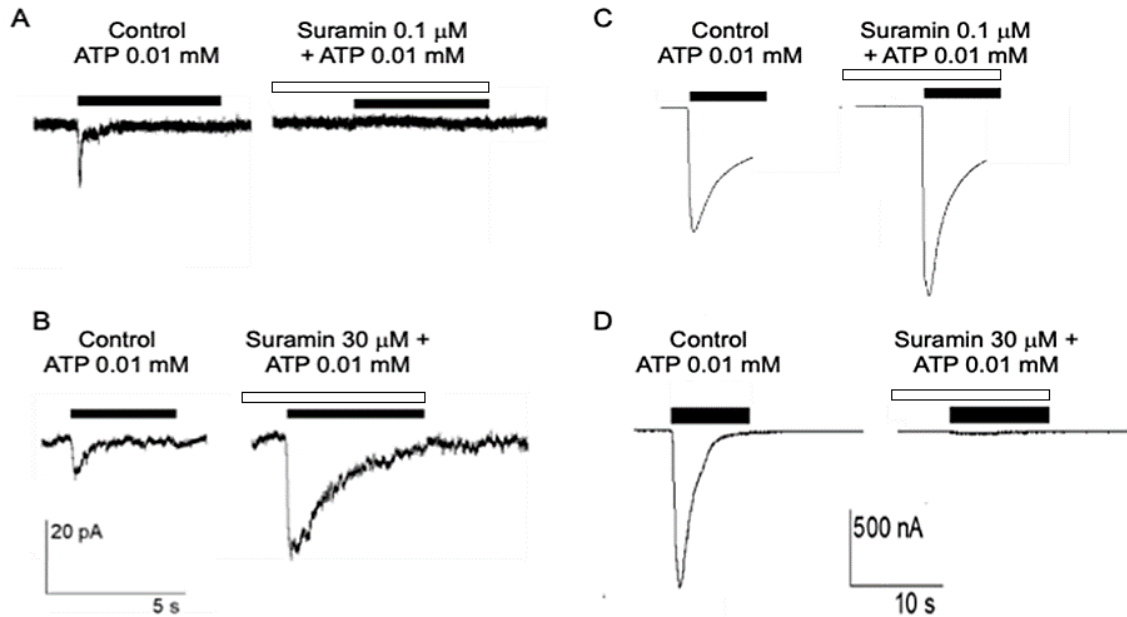


Figura 9. La suramina provoca potenciación e inhibición de las I_{ATP} (0.01 mM) en macrófagos de humano y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano homomérico. A) Suramina 0.1 μ M tiene un efecto inhibitorio sobre I_{ATP} de los receptores P2X nativos de macrófagos de humano (n = 6). Mientras que suramina 30 μ M. B) potenció las I_{ATP} en el 82% de los macrófagos registrados (n = 6). C) Contrario al efecto observado de la suramina sobre los receptores P2X nativos en macrófagos de humano. C) la suramina 0.1 μ M potencio las I_{ATP} en todos los ovocitos con expresión heteróloga del receptor P2X1 homomérico de humano (n = 6). D) suramina 30 μ M inhibió las I_{ATP} en todos los ovocitos registrados (n = 8). Las barras horizontales sobre los registros representan la duración de la aplicación de ATP (barra negra) y suramina (barra blanca).

8.9. Efectos de la suramina sobre las I_{ATP} 5 mM en macrófagos y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano.

Para evaluar el efecto de la suramina sobre las corrientes inducidas por 5 mM de ATP, se utilizó una concentración de suramina de 100 μ M. La corriente control se registró utilizando una concentración de ATP 5 mM y posteriormente se co-aplicó la misma concentración de ATP con suramina 100 μ M, esta última se aplicó 3 min antes de la aplicación de ATP. Después el macrófago u ovocito registrado se lavó durante 5 min con solución externa y luego se registró nuevamente con ATP 5 mM. La suramina 100 μ M inhibió las I_{ATP} 5 mM en todos los macrófagos (n = 9) y ovocitos que expresaron el receptor P2X1 recombinante (n = 3; Figura 10 A y B).

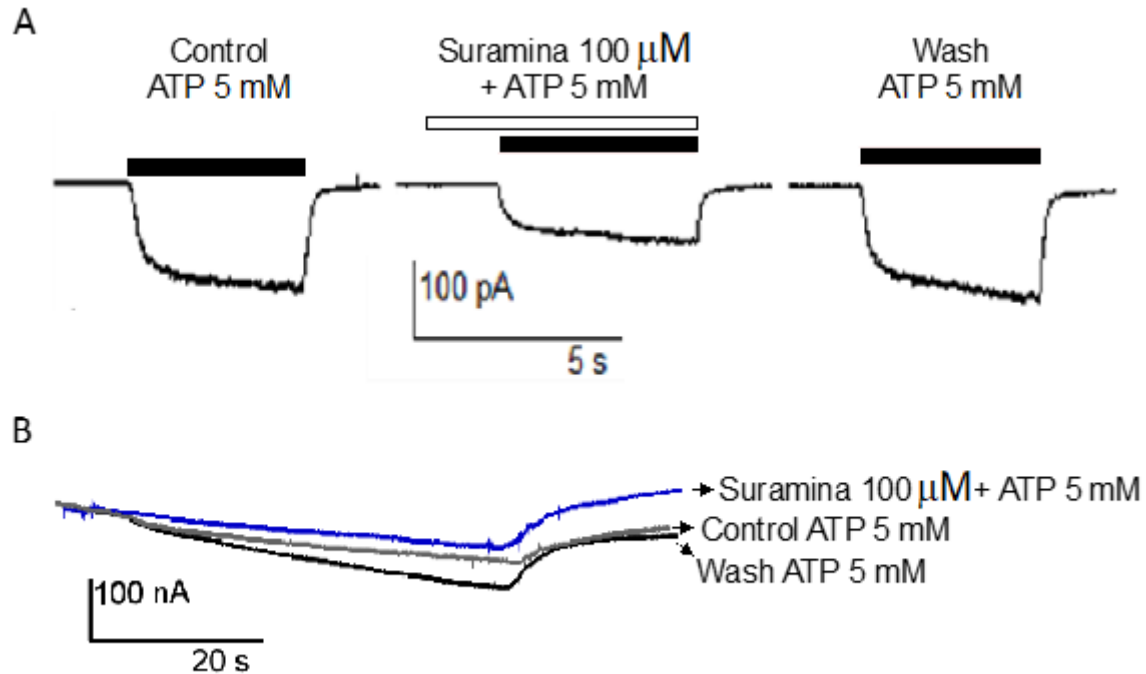


Figura 10. La suramina inhibe las I_{ATP} 5 mM en macrófagos de humano y ovocitos expresando el receptor P2X1 de humano homoméricos. A) Suramina 100 μ M tiene un efecto inhibitorio sobre I_{ATP} de los receptores P2X nativos de macrófagos de humano (n = 9). B) la suramina 100 μ M también inhibe las I_{ATP} en todos los ovocitos que expresaron el receptor P2X1 de humano (n = 3). Las barras horizontales sobre los registros representan la duración de la aplicación de ATP (barra negra) y suramina (barra blanca).

9. DISCUSION

Este estudio proporciona evidencia funcional de la expresión de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 en macrófagos de humano derivados de monocitos. Además, se describe por primera vez la co-expresión de estos receptores en el mismo macrófago, lo que podría tener importantes implicaciones para comprender la farmacología de los receptores P2X, dado el potencial de interacciones físicas entre ellos y la formación de heterómeros (Guo et al., 2007; Nicke et al., 2005; Schneider et al., 2017).

Es interesante observar que la diferenciación *in vitro* de los monocitos periféricos a macrófagos resultó en una regulación negativa de la expresión de los transcritos de las subunidades P2X1 y P2X1del, ya que el presente estudio muestra que el ARNm de las subunidades P2X1 y P2X1del están presentes en el 40 % y 5

% de los macrófagos diferenciados, respectivamente, un porcentaje menor con respecto al reportado para los monocitos en un trabajo previo (López-López et al., 2016), donde el 85 % de los monocitos periféricos humanos analizados expresaron ambas subunidades P2X1 y P2X1del. Hasta la fecha, no se tiene un estudio comparativo del nivel de expresión de las subunidades P2X entre monocitos y macrófagos diferenciados. Sin embargo, resultados similares a los nuestros han sido reportados en una línea celular de monocitos humana llamada THP-1 diferenciada a macrófagos (J. Layhadi, Fountain, 2017). Además, se ha demostrado que la expresión de las subunidades P2X está finamente regulada durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago (Siamon Gordon, Taylor, 2005), así como en subpoblaciones de monocitos con diferentes etapas de maduración (Lalitha Gudipaty et al., 2001). Por lo tanto, la diferencia en la expresión de la subunidad P2X1 entre monocitos y macrófagos podría estar relacionada al proceso de diferenciación y podría influir en la heterogeneidad de la expresión observada.

En este estudio también se muestra que el ARNm de las subunidades P2X4 y P2X7 está presente en el 20 % y 90 % de los macrófagos de humano, respectivamente. Estos valores están de acuerdo con un estudio previo en macrófagos de humano, donde utilizando PCR en tiempo real se reportan niveles de expresión de ARNm de la subunidad P2X7 mayores que los de la subunidad P2X4 (Janks et al., 2019). Sin embargo, en macrófagos diferenciados de la línea celular THP-1, se reporta una mayor expresión del ARNm de la subunidad P2X4 que la de la subunidad P2X7 (J. A. Layhadi, Fountain, 2019; J. Layhadi, Fountain, 2017). Ninguno de los estudios anteriores ofrece información sobre el porcentaje de macrófagos que expresan las subunidades P2X4 y P2X7, datos que nosotros pudimos determinar con el RT-PCR en célula única.

Las cinéticas de desensibilización de las I_{ATP} y la sensibilidad a los agonistas se utilizan a menudo como herramientas para discriminar entre los subtipos de receptores P2X. Bajo este contexto, en este estudio se identificaron dos tipos de corrientes inducidas con 0.01 mM de ATP en macrófagos de humano. El primer tipo de corriente mostró una cinética de desensibilización rápida y con una pérdida de la

corriente significativa tras aplicaciones repetidas de ATP en el 68 % de los macrófagos. Además, esta respuesta fue significativamente inhibida por la aplicación de PPADS. Estas propiedades corresponden a las reportadas previamente para el receptor P2X1 homomérico, que se caracteriza por una alta afinidad al ATP, una cinética de activación y desensibilización rápida, y una alta sensibilidad al bloqueo por el PPADS (Evans et al., 1995; R A North, Surprenant, 2000). Además, en el presente estudio, la expresión heteróloga del receptor P2X1 homomérico humano en ovocitos de *Xenopus laevis* mostraron corrientes de activación y desensibilización rápidas comparables con las observadas en los macrófagos. Todas estas observaciones, y el hecho de que el ARNm de la subunidad P2X1 se encuentra en el 40% de los macrófagos de humano, apoyan la participación del receptor P2X1 en las corrientes inducidas por bajas concentraciones de ATP.

El segundo tipo de corriente observada tras la aplicación de ATP 0.01 mM se presentó en el 32 % de los macrófagos registrados y mostró una farmacología distinta y una cinética de desensibilización lenta en comparación con la respuesta similar al receptor P2X1. Esta segunda respuesta fue insensible al PPADS y fue potenciada por el modulador alostérico ivermectina, dos propiedades distintivas del receptor P2X4 (Baljit S. Khakh et al., 1999; R Alan North, 2002). Resultados similares con ivermectina fueron encontrados en macrófagos alveolares humanos (Kessler et al., 2011). Además, la aplicación repetitiva de ATP en células que mostraron una corriente desensibilizante lenta resultó en un incremento sucesivo de la corriente tras cada aplicación de ATP y que alcanzó un incremento máximo hasta la cuarta aplicación del agonista. Se ha descrito una propiedad similar, conocida como "facilitación", para el receptor P2X7 (Chessell et al., 1997; Roger et al., 2008), pero no para el receptor P2X4 (Fountain, North, 2006). Sin embargo, se requieren concentraciones superiores a 1 mM de ATP para activar el receptor P2X7 (R Alan North, 2002). La co-expresión de los transcritos de P2X1, P2X4, y P2X7 encontrada en este estudio aumenta la posibilidad de la formación de receptores heteroméricos que pudiera estar alterando las propiedades del receptor P2X4. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que una eventual formación de receptores heteroméricos

P2X7/P2X4 podría explicar la respuesta de "facilitación" observada. En apoyo a esta hipótesis, existe evidencia de que la subunidad P2X4 puede ensamblarse heteroméricamente con la subunidad P2X7 (Guo et al., 2007; Schneider et al., 2017) y P2X1 (Nicke et al., 2005). Sin embargo, se requieren más estudios para investigar la presencia de estos supuestos canales heteroméricos. Estas observaciones y el hecho de que los receptores P2X4 se expresan en el 20 % de los macrófagos de humano, apoyan la participación del receptor P2X4 en las corrientes de desensibilización lenta inducidas por la baja concentración de ATP.

El presente estudio también demostró que la aplicación de ATP (5 mM) indujo tres respuestas P2X diferentes en macrófagos de humano: una corriente de activación lenta que no desensibiliza, otra de activación y desensibilización rápida, y una bifásica que es una combinación de una corriente rápida y no desensibilizante. Las corrientes desensibilizantes rápidas y bifásicas fueron similares a la respuesta del receptor homomérico P2X1 heterólogo expresado en ovocitos y fueron insensibles al antagonista selectivo de P2X7, A-804598. Además, se observaron respuestas rápidas y bifásicas en el 15 % y el 15 % de los macrófagos de humano, respectivamente. La suma de ambos corresponde al 30 % de los macrófagos, porcentaje muy cercano a la expresión del ARNm de P2X1 observada con RT-PCR de célula única. En un estudio previo, realizado con macrófagos de humano, se reportó una corriente bifásica muy similar a la presentada en este trabajo, y que fue inhibida significativamente por PPADS, KN-62 y BBG (del inglés, Brilliant Blue G) que son considerados como antagonistas de los receptores P2X7 (Eschke et al., 2002), razón por la cual los autores concluyeron que el receptor P2X7 es el responsable de las corrientes observadas en macrófagos. Sin embargo, estos autores utilizaron ATP 0.1 mM para activar y caracterizar las propiedades farmacológicas de los supuestos receptores P2X7, y utilizaron concentraciones micromolares de BBG. Actualmente, se sabe que se requieren concentraciones mayores de 1 mM de ATP para activar los receptores P2X7 (Fonfria et al., 2008; R Alan North, 2002), y que concentraciones micromolares de BBG pueden inhibir otros receptores P2X (Valdez-Morales et al., 2011). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el receptor P2X1 participa en la corriente rápida y bifásica inducida por

la alta concentración de ATP en los macrófagos de humano. No descartamos la posibilidad de que la corriente bifásica observada en macrófagos con alta concentración de ATP pueda deberse también a receptores heteroméricos P2X1/P2X7, puesto que encontramos la co-expresión de estos en el 25 % de los macrófagos. Sin embargo, hasta la fecha, no hay informes de que los receptores P2X1 y P2X7 se ensamblen como heteroméricos.

Por otro lado, nuestros resultados indican que las corriente de activación lenta y no desensibilizante activada por una alta concentración de ATP (5 mM) en el 69 % de los macrófagos de humano está mediada por la activación de los receptores P2X7, ya que la baja sensibilidad a ATP y la cinética no desensibilizante son características distintivas del receptor P2X7 (Jiang et al., 2005; R Alan North, 2002). Recientemente se ha demostrado la presencia de una variante de “splicing” de la subunidad P2X1 (P2X1del) en la mayoría de los monocitos humanos, cuyas corrientes solo se activaban con altas concentraciones de ATP (> 1 mM) y muestran una corriente no desensibilizante (López-López et al., 2016), similar a la descrita para el receptor P2X7 homomérico (Lalitha Gudipaty et al., 2001). Sin embargo, en el presente trabajo solo fuimos capaces de detectar esta variante en el 5% de los macrófagos, un porcentaje considerablemente más bajo que la expresión de la subunidad P2X7 (90 %). Además, el antagonista selectivo de P2X7, A-804598 (Donnelly-Roberts et al., 2009) inhibió la corriente no desensibilizante inducida por ATP 5 mM en macrófagos de humano. Por lo tanto, nuestros datos electrofisiológicos, junto con los datos de RT-PCR de célula única, indican fuertemente que el receptor P2X7 participa en la corriente no desensibilizante inducida por una alta concentración de ATP.

Nuestros resultados sobre el efecto de suramina sobre las I_{ATP} en macrófagos de humano revelaron que la suramina principalmente inhibe las I_{ATP} 0.01 mM a concentraciones micromolares bajas (0.1 mM) pero aparece un efecto potenciador a concentraciones más altas de suramina (30 μ M). Sin embargo, a concentraciones altas de suramina (100 μ M) y ATP (5 mM), predomina el efecto inhibitor. El efecto inhibitorio y potenciador de la suramina, como el que se muestra en este estudio,

también se ha observado en los receptores P2X nativos de neuronas mientéricas de cobayo (Guerrero-Alba et al., 2010). En dicho estudio, se sugiere que la suramina actúa sobre dos diferentes sitios de unión en los receptores P2X. Nuestros resultados de suramina sobre el receptor P2X1 homomérico humano expresado en ovocitos apoyan esta hipótesis, puesto que encontramos que la suramina tiene un efecto potenciador a concentraciones bajas (0.01 μ M) de suramina y un efecto inhibitorio a concentraciones más altas (30 y 100 μ M) sobre los receptores P2X1 homomérico, lo que indica la presencia de dos sitios de unión para la suramina con diferentes afinidades.

Es poco probable que los efectos de la suramina sobre los receptores P2X nativos en los macrófagos de humano se deba exclusivamente al receptor P2X1, debido a que el efecto inhibitorio se observó en macrófagos a concentraciones micromolares bajas de suramina, mientras que en ovocitos expresando el receptor P2X1 homomérico apareció a concentraciones micromolares altas. Lo mismo se encontró para el efecto potenciador de la suramina, ya que este efecto se observó a concentraciones micromolares altas en macrófagos, mientras que el mismo efecto se vio sobre los receptores P2X1 a concentraciones bajas. Además, el efecto predominante observado en cada macrófago depende de la concentración de ATP y suramina. Esto origina que el efecto de suramina sobre los receptores P2X nativos en los macrófagos de humano sea complejo, y esto probablemente esté relacionado con la co-expresión de las distintas subunidades P2X y a las diferencias en la estequiometría entre las diferentes subunidades.

Los macrófagos son una población celular muy heterogénea que responde a señales micro ambientales para producir diferentes fenotipos funcionales (Siamon Gordon, Taylor, 2005). Son un componente fundamental del sistema inmunológico innato y desempeñan un papel crucial en la defensa y homeostasis del huésped a través del reconocimiento y eliminación de bacterias, la eliminación de células dañadas, la liberación de mediadores proinflamatorios y antimicrobianos (Hirayama et al., 2018). El desequilibrio en los fenotipos funcionales de los macrófagos ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades, tales como: cáncer,

enfermedad de Alzheimer, síndrome metabólico, asma y alergias, aterosclerosis, fibrosis y enfermedades autoinmunes (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). En estas afecciones inflamatorias, existen varias fuentes de ATP, como son: células dañadas o necróticas y/o células intactas después de la estimulación de la liberación vesicular o mediante canales formadores de poros (Dosch et al., 2018). La expresión heterogénea de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 con diferentes afinidades al ATP permitiría un ajuste fino de la respuesta de los macrófagos en función de la concentración de ATP censada. En consecuencia, las concentraciones de ATP micromolares podrían activar selectivamente los receptores P2X1 y P2X4, lo que daría como resultado distintas cinéticas de desensibilización y, por lo tanto, diferentes concentraciones de entrada de calcio, capaces de desencadenar diversas vías de transducción intracelular. Mientras tanto, a niveles milimolares de ATP podría conducir a la activación del receptor P2X7, conocido por estar involucrado en numerosas vías intracelulares proinflamatorias (Adinolfi et al., 2018). En apoyo a esta hipótesis de interacción de ajuste fino, otros grupos de investigación han demostrado funciones específicas para los subtipos de receptor P2X. Por ejemplo, se estableció que el receptor P2X1, pero no el receptor P2X7, es necesario para la entrada del VIH en los macrófagos (Hazleton et al., 2012). Se observó que el receptor P2X4, pero no el receptor P2X7, contribuye a la secreción de CXCL5, una quimiocina proinflamatoria que regula la respuesta inmune innata (J. A. Layhadi et al., 2018). Asimismo, la secreción de IL-1 β inducida por ATP en macrófagos fue suprimida en ratones con deficiencia del receptor P2X7 (Geoffrey Burnstock, Boeynaems, 2014). Por otro lado, en varios trastornos inflamatorios crónicos y autoinmunes se han caracterizado fluctuaciones en la expresión de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 (G. Burnstock, Kennedy, 2011). Por lo tanto, los receptores P2X desempeñan funciones importantes en la señalización de los macrófagos, por lo que pueden representar objetivos terapéuticos prometedores en estas enfermedades.

10. CONCLUSION

Este estudio demuestra por primera vez la co-expresión de ARNm de P2X1, P2X4 y P2X7 y confirma la presencia funcional de los receptores P2X1, P2X4 y

P2X7 en macrófagos derivados de monocitos de humano. Se requieren más estudios para investigar la importancia fisiológica y el papel de la co-expresión de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 con sus distintas afinidades por el ATP en los macrófagos de humano.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K. A. H. L. S. P. (2015). *Inmunología Celular y Molecular* (8º Ed). Retrieved from <https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788490228944/Inmunología+Celular+y+Molecular+8º+Ed>
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, VOL. 58 N. 3. DOI: 10.1124/pr.58.3.3
- Abdallah, F., Mijouin, L., & Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2017/5095293
- Adinolfi, E., Giuliani, A. L., De Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E., & Di Virgilio, F. (2018, May 1). The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.12.021
- Akagawa, K. S., Komuro, I., Kanazawa, H., Yamazaki, T., Mochida, K., & Kishi, F. (2006). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology (Carlton, Vic.)*, VOL. 11 Suppl. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2006.00805.x
- Arulkumaran, N., Unwin, R. J., & Tam, F. W. (2011). A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, VOL. 20 N. 7. DOI: 10.1517/13543784.2011.578068
- Bell, P. D., Lapointe, J.-Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K.-I., ... Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, VOL. 100 N. 7. DOI: 10.1073/pnas.0736323100
- Bodin, P., & Burnstock, G. (2001). Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, VOL. 38 N. 6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707694>
- Bowler, J. W., Bailey, R. J., North, R. A., & Surprenant, A. (2003). P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *British Journal of Pharmacology*, VOL. 140 N. 3. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705459

- Burnstock, G., & Kennedy, C. (2011). P2X Receptors in Health and Disease. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 61, pp. 333–372). Academic Press Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4
- Burnstock, Geoffrey. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, VOL. 87 N. 2. DOI: 10.1152/physrev.00043.2006
- Burnstock, Geoffrey, & Boeynaems, J. M. (2014, December 20). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signalling*. Kluwer Academic Publishers. DOI: 10.1007/s11302-014-9427-2
- Burnstock, Geoffrey, & Williams, M. (2000). P2 Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function and Therapeutic Potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, VOL. 295 N. 3. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/295/3/862.full>
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., ... Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, VOL. 467 N. 7317. DOI: 10.1038/nature09413
- Chen, Q., Kang, J., & Fu, C. (2018, December 1). The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature. DOI: 10.1038/s41392-018-0018-5
- Chessell, I. P., Michel, A. D., & Humphrey, P. P. A. (1997). Properties of the pore-forming P2X7 purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, VOL. 121 N. 7. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701278
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., & Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*, VOL. 63 N. 3. DOI: 10.1124/pr.110.003129
- Corriden, R., & Insel, P. A. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling*, VOL. 3 N. 104. DOI: 10.1126/scisignal.3104re1
- Coutinho-Silva, R., Ojcius, D. M., Górecki, D. C., Persechini, P. M., Bisaggio, R. C., Mendes, A. N., ... Dunn, P. M. (2005). Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochemical Pharmacology*, VOL. 69 N. 4. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.11.012
- De Ita, M., Vargas, M. H., Carbajal, V., Ortiz-Quintero, B., López-López, C., Miranda-Morales, M., ... Montaña, L. M. (2016). ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sciences*, VOL. 145. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.013
- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000, July 4). The immune system. First of two parts. (I. R. Mackay & F. S. Rosen, Eds.) *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society . DOI: 10.1056/NEJM200007063430107
- Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2017, January 19). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/onc.2016.206
- Djaldetti, M., Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, R., & Bessler, H. (2002). Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microscopy Research and Technique*, VOL.

57 N. 6. DOI: 10.1002/jemt.10096

- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Surber, B., Vaidyanathan, S. X., Perez-Medrano, A., Wang, Y., ... Jarvis, M. F. (2009). [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, VOL. 56 N. 1. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.012
- Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., & Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. *International Journal of Molecular Sciences*. DOI: 10.3390/ijms19041222
- Duque Correa, M. a., & Rojas López, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, VOL. 26 N. 2. DOI: 10.1016/S0213-9626(07)70077-X
- Eligini, S., Brioschi, M., Fiorelli, S., Tremoli, E., Banfi, C., & Colli, S. (2015). Human monocyte-derived macrophages are heterogenous: Proteomic profile of different phenotypes. *Journal of Proteomics*, VOL. 124. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.03.026
- Eschke, D., Wüst, M., Hauschildt, S., & Nieber, K. (2002). Pharmacological characterization of the P2X 7 receptor on human macrophages using the patch-clamp technique. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, VOL. 365 N. 2. DOI: 10.1007/s00210-001-0501-2
- Evans, R. J., Derkach, V., & Surprenant, A. (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*, VOL. 357 N. 6378. DOI: 10.1038/357503a0
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A., & Surprenant, A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Molecular Pharmacology*, VOL. 48 N. 2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544432>
- Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J., & Hamilton, J. A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, VOL. 86 N. 2. DOI: 10.1189/jlb.1108702
- Fonfria, E., Clay, W. C., Levy, D. S., Goodwin, J. A., Roman, S., Smith, G. D., ... Michel, A. D. (2008). Cloning and pharmacological characterization of the guinea pig P2X 7 receptor orthologue. *British Journal of Pharmacology*, VOL. 153 N. 3. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707596
- Fountain, S. J., & North, R. A. (2006). A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, VOL. 281 N. 22. DOI: 10.1074/jbc.M600442200
- Gabel, C. A. (2007, March 3). P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signalling*. Springer. DOI: 10.1007/s11302-006-9034-y
- Gatof, D., Kilic, G., & Fitz, J. G. (2004). Vesicular exocytosis contributes to volume-sensitive ATP release in biliary cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, VOL. 286 N. 4. DOI: 10.1152/ajpgi.00355.2003

- Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., ... Randolph, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, VOL. 13 N. 11. DOI: 10.1038/ni.2419
- Gicquel, T., Victoni, T., Fautrel, A., Robert, S., Gleonnec, F., Guezingar, M., ... Lagente, V. (2014). Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, VOL. 41 N. 4. DOI: 10.1111/1440-1681.12214
- Gombault, A., Baron, L., & Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Frontiers in Immunology*, VOL. 3. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00414
- Gordon, S. (1986). Biology of the macrophage. *Journal of Cell Science*, VOL. SUPPL. 4 N. Supplement 4. DOI: 10.1242/jcs.1986.supplement_4.16
- Gordon, Siamon, Plüddemann, A., & Mukhopadhyay, S. (2020). Plasma membrane receptors of tissue macrophages: functions and role in pathology. *The Journal of Pathology*, VOL. 250 N. 5. DOI: 10.1002/path.5404
- Gordon, Siamon, & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*, VOL. 5 N. 12. DOI: 10.1038/nri1733
- Gu, B. J., Zhang, W. Y., Bendall, L. J., Chessell, I. P., Buell, G. N., & Wiley, J. S. (2000). Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, VOL. 279 N. 4. Retrieved from <http://ajpcell.physiology.org/content/279/4/C1189.abstract>
- Gudipaty, L., Humphreys, B. D., Buell, G., & Dubyak, G. R. (2001). Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C943
- Gudipaty, Lalitha, Humphreys, B. D., Buell, G., & Dubyak, G. R. (2001). Regulation of P2X7 nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, VOL. 280 N. 4 49-4. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.c943
- Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Juárez, E. H., Miranda-Morales, M., Ramírez-Martínez, J. F., Espinosa-Luna, R., & Barajas-López, C. (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *European Journal of Pharmacology*, VOL. 626 N. 2-3. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.09.063
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S., & Murrell-Lagnado, R. D. (2007). Evidence for Functional P2X4/P2X7 Heteromeric Receptors. *Molecular Pharmacology*, VOL. 72 N. 6. Retrieved from <http://molpharm.aspetjournals.org/content/72/6/1447.long>
- Hazleton, J. E., Berman, J. W., & Eugenin, E. A. (2012). Purinergic receptors are required for HIV-1 infection of primary human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, VOL. 188 N. 9. DOI: 10.4049/jimmunol.1102482

- Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2018, January 1). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. DOI: 10.3390/ijms19010092
- Hisadome, K., Koyama, T., Kimura, C., Droogmans, G., Ito, Y., & Oike, M. (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *The Journal of General Physiology*, VOL. 119 N. 6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034759>
- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in Immunology*, VOL. 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00486
- Homolya, L., Steinberg, T. H., & Boucher, R. C. (2000). Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *Journal of Cell Biology*, VOL. 150 N. 6. DOI: 10.1083/jcb.150.6.1349
- Housley, G. D., Greenwood, D., Bennett, T., & Ryan, A. F. (1995). Identification of a short form of the P2xR1-purinoceptor subunit produced by alternative splicing in the pituitary and cochlea. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, VOL. 212 N. 2. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1998
- Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, VOL. 104 N. 15. DOI: 10.1073/pnas.0611280104
- Huber-Lang, M., Lambris, J. D., & Ward, P. A. (2018, April 1). Innate immune responses to trauma review-article. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/s41590-018-0064-8
- Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, VOL. 509 N. 7500. DOI: 10.1038/nature13085
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015, March 19). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/ni.3123
- Janks, L., Sprague, R. S., & Egan, T. M. (2019). ATP-Gated P2X7 Receptors Require Chloride Channels To Promote Inflammation in Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, VOL. 202 N. 3. DOI: 10.4049/jimmunol.1801101
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., van Rooijen, N., ... Allen, J. E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, VOL. 332 N. 6035. DOI: 10.1126/science.1204351
- Jiang, L.-H., Rassendren, F., Mackenzie, A., Zhang, Y.-H., Surprenant, A., & North, R. A. (2005). N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X₇ receptors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, VOL. 289 N. 5. DOI: 10.1152/ajpcell.00253.2005
- Jo, E. K., Kim, J. K., Shin, D. M., & Sasakawa, C. (2016, March 1). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc Immunology. DOI: 10.1038/cmi.2015.95
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008).

- Connexin 43 Hemichannels Are Permeable to ATP. *Journal of Neuroscience*, VOL. 28 N. 18. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Kawano, A., Tsukimoto, M., Mori, D., Noguchi, T., Harada, H., Takenouchi, T., ... Kojima, S. (2012). Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, VOL. 420 N. 1. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.122
- Kessler, S., Clauss, W. G., Günther, A., Kummer, W., & Fronius, M. (2011). Expression and functional characterization of P2X receptors in mouse alveolar macrophages. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, VOL. 462 N. 3. DOI: 10.1007/s00424-011-0980-z
- Keystone, E. C., Wang, M. M., Layton, M., Hollis, S., McInnes, I. B., & D1520C00001 Study Team. (2012). Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Annals of the Rheumatic Diseases*, VOL. 71 N. 10. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-143578
- Khakh, B S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, VOL. 2 N. 3. DOI: 10.1038/35058521
- Khakh, Baljit S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C., & Lester, H. A. (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X4 receptor channels. *Journal of Neuroscience*, VOL. 19 N. 17. DOI: 10.1523/jneurosci.19-17-07289.1999
- Koshimizu, T., & Tsujimoto, G. (2006). Functional role of spliced cytoplasmic tails in P2X2-receptor-mediated cellular signaling. *Journal of Pharmacological Sciences*, VOL. 101 N. 4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891773>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, VOL. 30 N. 1. DOI: 10.3109/08830185.2010.529976
- Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., & Kumararatne, D. S. (1997). ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors. *Immunity*, VOL. 7 N. 3. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80364-7
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, VOL. 15 N. 12. DOI: 10.1038/nri3920
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011, November 25). Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nri3088
- Layhadi, J. A., & Fountain, S. J. (2019). ATP-Evoked Intracellular Ca²⁺ Responses in M-CSF Differentiated Human Monocyte-Derived Macrophage are Mediated by P2X4 and P2Y11 Receptor Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, VOL. 20 N. 20. DOI: 10.3390/ijms20205113
- Layhadi, J. A., Turner, J., Crossman, D., & Fountain, S. J. (2018). ATP Evokes Ca²⁺ Responses and CXCL5 Secretion via P2X 4 Receptor Activation in Human Monocyte-

- Derived Macrophages . *The Journal of Immunology*, VOL. 200 N. 3. DOI: 10.4049/jimmunol.1700965
- Layhadi, J., & Fountain, S. (2017). P2X4 Receptor-Dependent Ca²⁺ Influx in Model Human Monocytes and Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, VOL. 18 N. 11. DOI: 10.3390/ijms18112261
- Lees, M. P., Fuller, S. J., McLeod, R., Boulter, N. R., Miller, C. M., Zakrzewski, A. M., ... Smith, N. C. (2010). P2X7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii*, by Human and Murine Macrophages . *The Journal of Immunology*, VOL. 184 N. 12. DOI: 10.4049/jimmunol.1000012
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, VOL. 377 N. 6548. DOI: 10.1038/377432a0
- Liñan-Rico, A., Jaramillo-Polanco, J., Espinosa-Luna, R., Jiménez-Bremont, J. F., Liñan-Rico, L., Montañó, L. M., & Barajas-López, C. (2012). 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*, VOL. 63 N. 3. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.002
- Liu, H.-T., Toychiev, A. H., Takahashi, N., Sabirov, R. Z., & Okada, Y. (2008). Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Research*, VOL. 18 N. 5. DOI: 10.1038/cr.2008.49
- Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014, May 1). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher. DOI: 10.7150/ijbs.8879
- Lopez-Castejon, G., Theaker, J., Pelegrin, P., Clifton, A. D., Braddock, M., & Surprenant, A. (2010). P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, VOL. 185 N. 4. DOI: 10.4049/jimmunol.1000436
- López-López, C., Jaramillo-Polanco, J., Portales-Pérez, D. P., Gómez-Coronado, K. S., Rodríguez-Meléndez, J. G., Cortés-García, J. D., ... Barajas-López, C. (2016). Two P2X1 receptor transcripts able to form functional channels are present in most human monocytes. *European Journal of Pharmacology*, VOL. 793. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.10.033
- Marques-da-Silva, C., Burnstock, G., Ojcius, D. M., & Coutinho-Silva, R. (2011). Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology*, VOL. 216 N. 1–2. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.03.010
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, VOL. 11 N. 11. DOI: 10.1038/nri3073
- Myrtek, D., Müller, T., Geyer, V., Derr, N., Ferrari, D., Zissel, G., ... Idzko, M. (2008). Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion . *The Journal of Immunology*, VOL. 181 N. 3. DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.2181
- Nemazee, D. (2017, May 1). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nri.2017.19

- Nicke, A., Kerschensteiner, D., & Soto, F. (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *Journal of Neurochemistry*, VOL. 92 N. 4. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02939.x
- Nicke, A., Kuan, Y.-H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., ... Soto, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry*, VOL. 284 N. 38. DOI: 10.1074/jbc.M109.033134
- North, R A, & Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, VOL. 40. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563
- North, R Alan. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, VOL. 82 N. 4. DOI: 10.1152/physrev.00015.2002
- Placido, R., Auricchio, G., Falzoni, S., Battistini, L., Colizzi, V., Brunetti, E., ... Mancino, G. (2006). P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. *Cellular Immunology*, VOL. 244 N. 1. DOI: 10.1016/j.cellimm.2007.02.001
- Portales-Cervantes, L., Niño-Moreno, P., Doníz-Padilla, L., Baranda-Candido, L., García-Hernández, M., Salgado-Bustamante, M., ... Portales-Pérez, D. (2010). Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, VOL. 71 N. 8. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.05.008
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (2007). Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, VOL. 179 N. 3. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1913
- Quaresma, J. A. S. (2019, October 1). Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/CMR.00034-18
- Rankin, L. C., & Artis, D. (2018, April 19). Beyond Host Defense: Emerging Functions of the Immune System in Regulating Complex Tissue Physiology. *Cell*. Cell Press. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.013
- Rathinam, V. A. K., & Fitzgerald, K. A. (2016, May 5). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*. Cell Press. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.046
- Roger, S., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2008). Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *Journal of Neuroscience*, VOL. 28 N. 25. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0696-08.2008
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018, August 1). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network*. Korean Association of Immunologists. DOI: 10.4110/in.2018.18.e27
- Sawynok, J. (2007). Adenosine and ATP receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, VOL. 177. DOI: 10.1007/978-3-540-33823-9_11

- Schenten, D., & Medzhitov, R. (2011). The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. In *Advances in Immunology* (Vol. 109, pp. 87–124). Academic Press Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0
- Schneider, M., Prudic, K., Pippel, A., Klapperstück, M., Braam, U., Müller, C. E., ... Markwardt, F. (2017). Interaction of purinergic P2X4 and P2X7 receptor subunits. *Frontiers in Pharmacology*. DOI: 10.3389/fphar.2017.00860
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., ... Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, VOL. 336 N. 6077. DOI: 10.1126/science.1219179
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., ... Sahebkar, A. (2018, September 1). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc. DOI: 10.1002/jcp.26429
- Stokes, L., & Surprenant, A. (2009). Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *European Journal of Immunology*, VOL. 39 N. 4. DOI: 10.1002/eji.200838818
- SuellenD'arc Santos Oliveira, FerreiraNanini, H., Savio, L. E. B., CaldasWaghabi, 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. (2014). Macrophage P2X7 receptor function is Reduced during Schistosomiasis: Putative role of TGF-B1. *Hindawi*, VOL. 2014. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024943>
- Svennersten, K., Hallén-Grufman, K., de Verdier, P. J., Wiklund, N. P., & Poljakovic, M. (2015). Localization of P2X receptor subtypes 2, 3 and 7 in human urinary bladder. *BMC Urology*, VOL. 15. DOI: 10.1186/s12894-015-0075-9
- Takahashi, K. (2000). Development and differentiation of macrophages and their related cells. *Human Cell : Official Journal of Human Cell Research Society*. DOI: 10.3960/jslrt.41.1
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005, September 27). MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816
- Torres, G. E., Egan, T. M., & Voigt, M. M. (1999). Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits: SPECIFICITIES EXIST WITH REGARD TO POSSIBLE PARTNERS. *Journal of Biological Chemistry*, VOL. 274 N. 10. DOI: 10.1074/jbc.274.10.6653
- Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. *Science Signaling*, VOL. 2 N. 56. DOI: 10.1126/scisignal.256pe6
- Valdez-Morales, E., Guerrero-Alba, R., Liñán-Rico, A., Espinosa-Luna, R., Zarazua-Guzman, S., Miranda-Morales, M., ... Barajas-López, C. (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *European Journal of Pharmacology*, VOL. 668 N. 3. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.019

- Virgilio, D. F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, VOL. 47 N. 1. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.020
- Virgilio, Francesco Di. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells, VOL. 1 N. 3. DOI: 10.1007/s11302-005-6312-z
- Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G., & la Sala, A. (2012). Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*, VOL. 120 N. 3. DOI: 10.1182/blood-2012-01-406496
- Vulchanova, L., Arvidsson, U., Riedl, M., Wang, J., Buell, G., Surprenant, A., ... Elde, R. (1996). Differential distribution of two ATP-gated ion channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, VOL. 93 N. 15. DOI: 10.1073/pnas.93.15.8063
- Wewers, M. D., & Sarkar, A. (2009). P2X7 receptor and macrophage function. *Purinergic Signalling*, VOL. 5 N. 2. DOI: 10.1007/s11302-009-9131-9
- Worthington, R. A., Dutton, J. L., Poronnik, P., Bennett, M. R., & Barden, J. A. (1999). Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. *Electrophoresis*, VOL. 20 N. 10. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990701)20:10<2065::AID-ELPS2065>3.0.CO;2-E
- Xiang, Z., Lv, J., Jiang, P., Chen, C., Jiang, B., & Burnstock, G. (2006). Expression of P2X receptors on immune cells in the rat liver during postnatal development. *Histochem Cell Biol*, VOL. 126. DOI: 10.1007/s00418-006-0180-7
- Yeung, D., Kharidia, R., Brown, S. C., & Górecki, D. C. (2004). Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiology of Disease*, VOL. 15 N. 2. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.10.014
- Zumerle, S., Cali, B., Munari, F., Angioni, R., Di Virgilio, F., Molon, B., & Viola, A. (2019). Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. *Cell Reports*, VOL. 27 N. 1. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.011

ANEXOS

Anexo A: Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-PCR de célula única.

<i>Gen y número de accesoión</i>	<i>Nombre clave del primer</i>	<i>SENTIDO: 5' → 3'</i>	<i>TM</i>	<i>pb</i>	
<i>GAPDH</i> NM_001357943.2	Ext Fow	TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	60.18	786	
	Ext Rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	58.76		
	Int Fow	CCATCACCATCTTCCAGGAG	57.37	118	
	Int Rev	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	60.03		
<i>P2X1</i> NM_002558.4	Ext Fow	CCCCCAGAAGCTCTACCAT	58.06	1330	
	Ext Rev	TGCACCCAGTCAGGAGTT	58.01		
	1° Ani Fow	CGGGTGGGTGTTTCTCTATG	57.98	627	
	1° Ani Rev	CCAACCACTCCACCCTTCTC	59.96		
	2° Ani Fow	CTCATCAGCAGTGTCTCTGT	56.97	402	
	2° Ani Rev	GCTGATGCTGTTCTTGATGA	56.13		
	<i>del</i> Fow	GACATCCCGCGCATCAGC	61.64	197	
	<i>del</i> Rev	CCAACCACTCCACCCTTCTC	59.96		
<i>P2X4</i> NM_002560.3	Ext Fow	AAGCTTCAGACCGACTAGGGGACT	64.73	1384	
	Ext Rev	CTCGAGTGGAGTGGAGACTCAATCAG	64.19		
	1° Ani Fow	TTCCTGTTCGAGTACGA	51.66	872	
	1° Ani Rev	CTGTAGTACTTGGCAAAC	50.30		
	2° Ani Fow	CGTTACGACCAAGGTCAAGGG	60.94	543	
	2° Ani Rev	TGGAAACTGTGCCTGCGTTC	61.08		
	Ext Fow	AAGCTTGCCCTGTCAGGAAGAGT	64.0	1165	
	Ext Rev	ATATGGGAGCGACAGCAGTTA	58.96		
	<i>P2X7</i> NM_002562.6	1° Ani Fow	AAGAGGAGATCGTGGAGAATGGA	60.63	886
		1° Ani Rev	ATATGGGAGCGACAGCAGTTA	58.96	
2° Ani Fow		GCCACAACCTACACCACGAGA	59.97	375	
2° Ani Rev		CGGTGCCAAAAACCAGGATG	60.04		

Anexo B: publicaciones

- Eydie M. Vargas-Martínez, Karen S. Gómez-Coronado, Rosa Espinosa-Luna, Eduardo E. Valdez-Morales, Tonatiuh Barrios-García, Alma Barajas-Espinosa, Fernando Ochoa-Cortes, Luis M. Montaña, Carlos Barajas-López, Raquel Guerrero-Alba,
Functional expression of P2X1, P2X4 and P2X7 purinergic receptors in human monocyte-derived macrophages,
European Journal of Pharmacology,
Volume 888,
2020,
173460,
ISSN 0014-2999,
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173460>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299920305525>)
- Vargas-Martínez E.M., Gómez-Coronado K.S., Espinosa-Luna R., Montaña-Ramírez L.M., Valdez-Morales E.E., Guerrero-Alba R., Barajas-López C. (2019).
Pharmacological Properties of P2X Receptors In Human Macrophages. Revista Bio Ciencias 6: (Supl) Memorias IV Congreso de la Sociedad Mexicana de Neuroinmunoendocrinología. e839.
<https://doi.org/10.15741/revbio.06.suppl.e839>