



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

DETECCIÓN DE LA FORMA NATIVA DEL RECEPTOR
PURINÉRGICO P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS
HUMANAS EN CONDICIONES BASALES

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: García Alberruche, Elisa

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Director/a Experimental: MARTINEZ CUESTA, M ANGELES

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

DETECCIÓN DE LA FORMA NATIVA DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS HUMANAS EN CONDICIONES BASALES

RESUMEN

P2X7 es un receptor inotrópico ligado al canal del calcio implicado en respuestas de daño (trombo-inflamación). Incomprensiblemente, el receptor para ser activado requiere concentraciones de ATP endógeno prácticamente inexistentes en los tejidos; y tras ello abre un poro que permeabiliza la membrana celular inespecíficamente, inusual para los receptores P2X, a numerosas moléculas de alto peso molecular. No obstante, la mayoría de los estudios han sido realizados en células animales y/o transfectadas. En humanos, se ha descrito que es un receptor altamente polimórfico, y a pesar de haberse detectado en células endoteliales (HUVEC), existe mucha controversia respecto a su localización en células inflamatorias y trombóticas. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo detectar la forma nativa del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas, ya que la isoforma específica del receptor en un entorno celular concreto condiciona su activación, y puede explicar funciones diferentes de las descritas hasta la fecha. El aislamiento de los neutrófilos y plaquetas humanas se realiza a partir de sangre procedente de donantes sanos, y las células HUVEC proceden del cordón umbilical de mujeres tras el parto. Se ha confirmado la expresión basal del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas mediante Western blot. En neutrófilos, ha sido necesario optimizar el método de extracción de proteína para evitar la degradación del receptor. Los datos han demostrado que mantener los neutrófilos a 4°C durante el aislamiento, así como utilizar una buena proporción de solución de lisis por número de neutrófilos con alto contenido de inhibidores de proteasas es necesario para obtener un buen rendimiento proteico medido por expresión de GADPH. Adicionalmente, la elección del anticuerpo anti-P2X7 específico es fundamental para una detección precisa. El anticuerpo ab93354 ha permitido detectar el receptor P2X7 en neutrófilos, plaquetas y HUVEC de forma específica y reproducible. Los estímulos pro-inflamatorios y pro-fibróticos a las 4 horas no afectaron la expresión del receptor P2X7 en neutrófilos, plaquetas ni HUVEC, excepto por el ATP en altas concentraciones, que disminuyó la expresión del receptor en neutrófilos humanos asociado a mecanismos de autorregulación celular. Además, se observó mediante RT-PCR que el LPS aumentó la expresión génica del receptor P2X7 e Il- β 1, mientras que el TFG- β 1 disminuyó la expresión de los receptores P2X4 y P2X7 en neutrófilos. Este estudio se destaca por ser uno de los primeros en localizar el receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas mediante Western blot, utilizando un anticuerpo validado comercialmente, y realizando un análisis paralelo en diferentes tejidos humanos. Se han señalado las limitaciones y debilidades de los enfoques previos utilizados para detectar el receptor, proporcionando una base sólida para futuras investigaciones. Por último, la detección del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas ofrece perspectivas prometedoras para su potencial uso como objetivo terapéutico emergente en enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes en el desarrollo de tratamientos más específicos y efectivos para estas condiciones médicas. Adicionalmente, el presente trabajo se alinea con los objetivos de la agenda 2030: ODS 3 y, ODS 9 con un grado de relación alto.

Palabras clave Receptor purinérgico, P2X7, trombo-inflamación, ATP, Western blot, RT-PCR, polimórfico, isoformas, neutrófilo, plaqueta

Autor Dña. Elisa García Alberruche

Localidad y fecha Valencia, 28 de Julio de 2023

Directora experimental Prof. Dña. M^a Ángeles Martínez Cuesta

Tutor académico Prof. Dña. Esther Giraldo Reboloso

DETECTION OF THE NATIVE FORM OF THE P2X7 PURINERGIC RECEPTOR IN HUMAN NEUTROPHIL AND PLATELETS UNDER BASAL CONDITIONS

ABSTRACT

P2X7 is an ionotropic receptor linked to the calcium channel involved in damage responses (thrombo-inflammation). Incomprehensibly, to be activated, the receptor requires concentrations of endogenous ATP that are practically nonexistent in tissues, after which it opens a pore that nonspecifically permeabilizes the cell membrane, which is unusual for P2X receptors, allowing numerous molecules of high molecular weight to pass through. However, most studies on this receptor have been conducted in animal and/or transfected cells. In humans, it has been described as a highly polymorphic receptor, and despite being detected in endothelial cells (HUVECs), there is much controversy regarding its localization in inflammatory and thrombotic cells. Therefore, the present study aims to detect the native form of the P2X7 receptor in human neutrophils and platelets, since the specific isoform of the receptor in a specific cellular environment condition its activation and it may explain different functions from those described so far. Human neutrophils and platelets are isolated from blood obtained from healthy donors, and HUVECs are derived from the umbilical cord of women after childbirth. The basal expression of the P2X7 receptor in human neutrophils and platelets has been confirmed by Western blot. For neutrophils, it was necessary to optimize the protein extraction method to avoid receptor P2X7 degradation. The data has shown that keeping neutrophils at 4°C during isolation, as well as using a proper ratio of lysis solution per number of neutrophils with a high content of protease inhibitors, is necessary to achieve good protein yield measured by GAPDH expression. Additionally, the choice of a specific anti-P2X7 antibody is crucial for accurate detection. The ab93354 antibody has allowed specific and reproducible detection of the P2X7 receptor in neutrophils, platelets, and HUVECs. Pro-inflammatory and pro-fibrotic stimuli at 4 hours did not affect the expression of the P2X7 receptor in neutrophils, platelets, or HUVECs, except for ATP at high concentrations, which decreased the receptor expression in human neutrophils associated with cellular autoregulation mechanisms. Furthermore, it was observed through RT-PCR that LPS increased the gene expression of the P2X7 receptor and $IL-1\beta$, while TGF- β 1 decreased the expression of the P2X4 and P2X7 receptors in neutrophils. This study stands out for being one of the first to locate the P2X7 receptor in human neutrophils and platelets using Western blot, employing a commercially validated antibody, and conducting a parallel analysis in different human tissues. The limitations and weaknesses of previous approaches used to detect the receptor have been highlighted, providing a solid basis for future research. Finally, the detection of the P2X7 receptor in neutrophils and platelets offers promising perspectives for its potential use as an emerging therapeutic target in cardiovascular and inflammatory diseases. These findings could have significant implications for the development of more specific and effective treatments for these medical conditions. Additionally, this study aligns with the goals of the 2030 agenda: SDG 3 and SDG 9 with a high degree of relevance.

Keywords Purinergic receptor, P2X7, thrombo-inflammation, ATP, Western blot, RT-PCR, polymorphic, isoforms, neutrophil, platelet

Author Ms. Elisa García Alberruche

Location and date Valencia, 28 of July of 2023

Experimental director Prof. Ms. M^a Ángeles Martínez Cuesta

Academic tutor Prof. Ms. Esther Giraldo Reboloso

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, primero de todo, a mi tutora experimental por ofrecerme la oportunidad de trabajar en el proyecto, así como escucharme, aconsejarme y posibilitarme autonomía en el proceso, todo lo cual ha sido invaluable para mi crecimiento académico. Quiero extender mi gratitud a todas las integrantes del laboratorio 1 del departamento por su constante disposición a ayudarme y compartir su conocimiento conmigo, así como su compañía durante el proceso. Vuestra pasión y dedicación por la ciencia me han inspirado enormemente.

Agradezco de corazón a mi familia por apoyarme en todo momento en el camino que emprendí hace unos años al empezar esta carrera llena de dedicación y sacrificio. Vuestra confianza en mí y creencia en mi potencial han sido fundamentales en esta etapa de crecimiento.

Sobre todo, quiero recordar a mi yayita que nos dejó repentinamente durante el tiempo que estuve realizando este trabajo y que allá donde esté, sé que sentirá muy orgullosa de todo lo que he logrado. Además, a mi yayito, por ser fuerte en esta difícil nueva realidad y apoyarme en mis estudios como el que más.

A mi otra familia valenciana, agradezco profundamente el vínculo de amistad sólida que hemos construido. El apoyo mutuo que nos hemos brindado mientras enfrentábamos la experiencia de estudiar lejos de nuestros hogares ha tenido un valor incalculable. Espero con entusiasmo el futuro que nos espera y sé que juntos afrontaremos cada desafío.

A mi pareja, mi más profundo agradecimiento por ser mi pilar fundamental en este periodo de mi vida. Tu apoyo incondicional y presencia en los momentos difíciles me han dado fuerzas para seguir adelante y alcanzar mis metas.

En última instancia, quiero expresar gratitud hacia mí misma por haber persistido en la búsqueda de mis sueños y nunca haber renunciado. Todo este camino ha sido una experiencia de aprendizaje y crecimiento personal, y me siento verdaderamente orgullosa de lo que he logrado hasta ahora.

"El conocimiento obtenido a través de la investigación es la llave que desbloquea las puertas del futuro."

Marie Curie, científica y dos veces ganadora del Premio Nobel en Física y Química.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA.....	1
1.2. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7.....	2
1.2.1. Gen P2X7	2
1.2.2. Proteína P2X7: estructura.....	3
1.2.3. Activación del receptor.....	4
1.3. DIVERSIDAD DEL RECEPTOR P2X7	5
1.3.1. Polimorfismos	5
1.3.2. Variantes de <i>splicing</i>	6
1.3.3. Modificaciones postraduccionales.....	7
1.4. PAPEL DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 EN LA TROMBOINFLAMACIÓN	8
1.4.1. El neutrófilo.....	8
1.4.2. La plaqueta	9
1.4.3. El endotelio vascular	10
1.5. CONTROVERSA RESPECTO AL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. MUESTRAS.....	13
3.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO CELULAR	13
3.2.1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales (HUVEC)	13
3.2.2. Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) a 37°C y a 4°C	13
3.2.2.1. Modificaciones del protocolo	14
3.2.3. Aislamiento de plaquetas.....	14
3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO	15
3.3.1. Recogida de las células.....	15
3.4. WESTERN BLOT	15
3.4.1. Obtención de extractos proteicos.....	16
3.4.2. Cuantificación de proteína: ensayo BCA	16
3.4.3. Protocolo de la técnica.....	16
3.4.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	16
3.4.3.2. Transferencia a membrana de nitrocelulosa	17
3.4.3.3. Incubación con anticuerpos	17
3.4.3.4. Revelado: detección por quimioluminiscencia.....	18
3.4.3.5. Análisis densitométrico de las bandas	18

3.5. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)	18
3.5.1. Extracción y cuantificación de ARN procedente de la muestra experimental	18
3.5.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa.....	19
3.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real	19
3.6. ESTADÍSTICA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS	20
4. RESULTADOS.....	20
4.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE LA TÉCNICA WESTERN BLOT PARA PMNs.....	20
4.2. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS HUMANAS EN CONDICIONES BASALES.....	23
4.2.1. Expresión de la proteína P2X7 en PMNs empleando distintos anticuerpos..	23
4.3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS HUMANAS TRAS ESTÍMULOS INFLAMATORIOS Y FIBRÓTICOS	25
4.4. EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X7, P2X4 Y DE OTROS MEDIDADORES INFLAMATORIOS	26
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35
8. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ARNm codificante para proteína P2X7. (A) La estructura exónica del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) P2RX7 de longitud completa (exones 1 a 13) que codifica la subunidad P2X7A de 595 aminoácidos. Las regiones correspondientes de la subunidad P2X7A que se traducen del ARNm se ilustran debajo de la estructura exónica con los colores alineados con las regiones que se muestran. (B) Dominios de interés ubicados dentro del terminal carboxi de la subunidad P2X7A. (De Salis <i>et al.</i> , 2022).....	3
Figura 2. Topología del receptor P2X7 (P2X7R). (A) Estructura secundaria del monómero P2X7R con cinco dominios; extracelular, transmembrana 1 (TM1), transmembrana 2 (TM2), N-terminal intracelular y C-terminal intracelular. Los colores en los dominios representan posibles sitios de reconocimiento molecular específicos. (B) Coensamblaje de los tres monómeros P2X7R (púrpura, azul y naranja) en la posición del receptor trimérico que muestra posibles moléculas circundantes que podrían interactuar con los diferentes dominios. (C) El monómero P2X7 representado como estructura secundaria (izquierda) y estilos de superficie molecular (derecha) que se asemejan a un delfín. (D) Vista superior de la estructura P2X7R que abarca los tres bolsillos extracelulares de unión a ATP (líneas discontinuas naranjas) y los tres bolsillos adicionales de unión a fármacos (líneas discontinuas negras). (Martínez-Cuesta <i>et al.</i> , 2020).....	4
Figura 3. Sitios polimórficos en la secuencia primaria del receptor P2X7. El código de colores identifica las variantes de pérdida de función (rojo) y las variantes de ganancia de función (verde). Las regiones con motivos de dileucina están sombreadas en azul. Los sitios de N-glicosilación se muestran en cuadros morados. (Wiley <i>et al.</i> , 2011)	6
Figura 4. Variantes de empalme del receptor P2X7. Se representan 10 isoformas diferentes derivadas de splicing alternativo y mutaciones de los 13 exones del gen. La isoforma P2X7A es la forma nativa, expresada en todas las especies de mamíferos. Las isoformas alteradas detectadas en humanos son P2X7B, H y J, mientras que en roedores son P2X7B, C, D y K. Las mutaciones que conducen a la inserción de un codón de parada originan un receptor P2X7 acortado en el dominio carboxi-terminal y no pueden formar poros que inducen la muerte celular. P2X7G y H presentan una copia del exón 3 (N3) cerca del amino terminal. Las funciones básicas conocidas para cada isoforma se describen en el sitio derecho del panel. (De Salis <i>et al.</i> , 2022)	7
Figura 5. Activación del inflammasoma NLRP3 por el receptor P2X7 y liberación de citoquinas. (Pelegri, 2021)	8
Figura 6. Procedimiento de aislamiento de PMNs. Adaptado de “Isolate Cells from Blood”, por BioRender.com (2023). Obtenido de https://app.biorender.com/biorender-templates	14
Figura 7. Procedimiento de aislamiento de plaquetas. Creado con BioRender.com.	15
Figura 8. Western blot del receptor P2X7 en PMNs humanos y HUVEC. Los extractos proteicos de PMNs (carga 25 µg o 85 µg de proteína) proceden de 8 donantes (D1-D8), y los de HUVEC (carga 12µg de proteína) proceden de 3 cordones umbilicales (H1-H3). β -actina y GAPDH fueron utilizados como control de carga. Los anticuerpos utilizados fueron ab93354 (Abcam), A5060 (Sigma-Aldrich) y MA5-15738 (ThermoFisher Scientific) para la detección del receptor P2X7, β -actina y GAPDH, respectivamente.....	21
Figura 9. Western blot del GAPDH en PMNs humanos con diferentes condiciones experimentales. Los extractos proteicos de PMNs proceden de 12 donantes (D1-12) (carga 25 µg de proteína) con condiciones experimentales diferenciales respecto a; <i>la temperatura de aislamiento</i> de PMNs (37 °C y 4 °C), <i>la composición de las soluciones de lisis</i> (B1 y B2) para la extracción proteica, y <i>la proporción de número de células por volumen de solución de lisis</i> (>10 ⁶ cél/µL y <5×10 ⁵ cél/µL). La numeración repetida en los donantes D9-12 significa que las bandas corresponden al mismo donante. El anticuerpo para la detección del GAPDH utilizado es MA5-15738 (ThermoFisher Scientific).	22
Figura 10. Cuantificación de la intensidad de la banda de GAPDH en extractos proteicos de PMNs humanos obtenidos en diferentes condiciones experimentales. (A) <i>Diferente proporción</i>	

de células por volumen de solución de lisis; la extracción proteica se ha realizado con un número inferior a 5×10^5 y superior a 5×10^5 PMNs/ μ L de solución de lisis de nº de donantes ($n \geq 7$). (B) Diferente temperatura (4°C y 20°C) durante el aislamiento de PMNs; los extractos proteicos se obtuvieron de ~ 50.000 PMNs/ μ L de solución de lisis ($n \geq 4$). (C) Diferente composición de solución de lisis B1 vs B2; tras aislar los PMNs a 4°C y a partir de extracción proteica de ~ 50.000 PMNs/ μ L de ($n \geq 2$). Los datos fueron analizados con el análisis estadístico t-test Mann-Whitney (no paramétrico) ($p < 0.05$ y *** $p < 0.001$). 23*

Figura 11. Membranas de Western blot de extractos de PMNs humanos (A), plaquetas (B) y HUVEC (C) frente a dos anticuerpos diferentes frente al receptor P2X7. ab93354 (Abcam) localiza la zona N-terminal del receptor y P9122 (Sigma-Aldrich) localiza el epítipo extracelular del receptor. Procedencia de la muestra; donante (D) y cordón umbilical (H). 25

Figura 12. Análisis de la expresión proteica mediante la técnica de biología molecular Western blot a partir de extractos de (A) PMNs humanos, (B) plaquetas y (C) HUVEC tras 4 h de tratamiento con estímulos inflamatorios y pro-fibróticos. Las gráficas muestran la expresión de P2X7 expresado en porcentaje vs. control, utilizando como control de carga la GAPDH, tras el tratamiento con H_2O y solución salina (SS) como vehículos, TFG- β 1 (5ng/mL), ATP (4mM) y LPS (50ng/mL). También se muestran las membranas más representativas de los Western blot realizados para la proteína analizadas junto con el control de carga empleado. Los resultados de las gráficas se representan como la media \pm SEM (en PMNs, $n=7$; en plaquetas, $n=3$; en HUVEC, $n=2$). Los datos fueron analizados con el análisis estadístico Anova Kruskal-Wallis (no paramétrico) por las correcciones de Dunn (* $p < 0.05$). 26

Figura 13. Efectos de estímulos proinflamatorios y profibróticos en la expresión de los genes (A) P2X7, (B) P2X4, (C) IL- β 1 y (D) TFG- β 1 en PMNs. La expresión fue analizada por RT-qPCR después de 4 h de tratamiento de los PMNs con TFG- β 1 (5ng/mL), ATP (4mM) y LPS (50ng/mL). Los resultados se representan respecto al vehículo (1 fold) de la media \pm SEM de $n \geq 3$. El análisis estadístico t-test Kolmogorov-Smirnov (no paramétrico) fue empleado para analizar los resultados (* $p < 0.05$ vs vehículo). 27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Artículos que han testado la existencia del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas.	11
Tabla 2. Estímulos pro-inflamatorios y pro-fibróticos empleados en PMNs, HUVEC y PRP.	15
Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados, junto con la dilución utilizada, su peso molecular y el revelador adecuado, para la detección de las proteínas P2X7, β-actina y GAPDH mediante la técnica de biología molecular Western blot.	17
Tabla 4. Condiciones utilizadas para la síntesis del ADNc empleando el termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems).	19
Tabla 5. Pares de cebadores específicos para humanos empleados en la técnica de biología molecular qRT-PCR.	20

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AINE	Medicamento Antiinflamatorio No Esteriodes
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Seroalbúmina bovina
CT	Ciclo de umbral
D	Donantes de sangre
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GTP	Guanosina Trifosfato
H	Donantes de cordón umbilical
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hank
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
HUVEC	Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-18	Interleucina-18
LPS	Lipopolisacárido
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
NLRP3	Proteína 3 relacionada con NLR
p	p-value
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMNs	Neutrófilos Polimorfonucleares
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
P2X4R	Receptor P2X4
P2X7R	Receptor P2X7
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SEM	Error Estándar de la Media
SH3	Dominio SRC homología 3
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SS	Solución Salina
TBS-T	Solución de Tris Salina-Tween
TFG- β 1	Factor de Crecimiento Transformante Beta 1
TM1	Dominio Transmembrana 1
TM2	Dominio Transmembrana 2
TNFR1	Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UTP	Uridina Trifosfato

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA

El término "*purinérgico*" fue introducido en una carta breve a la revista Nature en 1971 (Burnstock, 1971), y en 1972, Geoffrey Burnstock propuso el de "*señalización purinérgica*", que señala a los nucleósidos y nucleótidos como moléculas de señalización extracelular (adenosina, AMP, ADP, ATP, UTP y GTP) (Burnstock, 1972; Lazarowski y Schwarzbau, 2009). Inicialmente, la hipótesis de Burnstock fue recibida con escepticismo por la comunidad científica (Webb *et al.*, 1993; Ralevic y Burnstock, 1998) ya que las purinas y pirimidinas se conocían desde hace mucho tiempo como elementos fundamentales en la bioenergética a nivel intracelular (Drury y Szent-Györgyi, 1929), y era poco probable que estas moléculas tan ubicuas estuvieran involucradas en la señalización extracelular (Burnstock, 1996). Sin embargo, en la década de 1990, la teoría comenzó a ser aceptada gradualmente después de la clonación y caracterización molecular de los subtipos de receptores para purinas y pirimidinas (Ralevic y Burnstock, 1998), y se descubrió que los nucleósidos y nucleótidos actúan crucialmente como moléculas de señalización intercelular o autocrina (Burnstock y Ralevic, 2014) capaces de activar receptores purinérgicos. En 1978, Burnstock propuso una clasificación de los receptores purinérgicos:

- (i) Receptores P1, selectivos de la adenosina y acoplados a proteínas G.
- (ii) Receptores P2, activados por nucleótidos (ADP y/o ATP), que se dividen en dos clases estructural y funcionalmente distintos:
 - Receptores P2Y, metabotrópicos, acoplados a proteínas G y activados principalmente por ADP.
 - Receptores P2X que son ionotrópicos y se activan por ligandos, principalmente ATP. (Burnstock, 1978)

Estos receptores, presentes en etapas tempranas de la evolución, son algunos de los receptores más abundantes en los organismos vivos y regulan numerosos procesos fisiológicos y/o patológicos como; la neurotransmisión, la contracción muscular, el metabolismo óseo, el metabolismo del glucógeno hepático, la función cardíaca, el tono vascular, la inflamación, la hemostasia y la trombosis (Hechler y Gachet, 2015). Por lo tanto, actualmente los receptores purinérgicos se consideran dianas terapéuticas atractivas para dar respuesta a una amplia gama de enfermedades (Ciruela y Jacobson, 2023). Por ejemplo, los fármacos antagonistas de los receptores P2Y plaquetarios son ampliamente utilizados en la clínica para eventos aterotrombóticos.

En la mayoría de los casos, los nucleótidos extracelulares actúan a través de sus receptores como potentes co-estímulos, amplificando y manteniendo las respuestas a los neurotransmisores, hormonas, citocinas y otros agentes. Pueden ser liberados a través de mecanismos específicos que involucran diferentes proteínas de la membrana plasmática (panexinas o los hemicanales de conexinas), o mediante la activación celular y la secreción de gránulos, como en el caso de las plaquetas sanguíneas. También pueden liberarse de manera pasiva en respuesta a estrés mecánico o cambios en las condiciones homeostáticas, incluyendo la anoxia y la lesión por isquemia-reperfusion (Hechler y Gachet, 2015). El equilibrio entre la liberación al medio extracelular de dichos nucleótidos junto con su degradación continua por los sistemas enzimáticos específicos confiere más complejidad, si cabe, al sistema purinérgico; el cual es diverso por naturaleza a nivel de los subtipos de receptores con diferente sensibilidad y selectividad (Coddou *et al.*, 2011; Hechler y Gachet, 2015).

En particular, el receptor P2X7 es el último receptor purinérgico descrito y pertenece a la familia P2X. La familia P2X consta de siete subtipos (P2X1-7) que son altamente permeables al calcio y median la rápida despolarización de las células cuando son activados por ATP y otros nucleótidos (Huang *et al.*, 2021; Tam *et al.*, 2023). La principal diferencia entre los receptores P2X está en su selectividad (Hechler y Gachet, 2015) y sensibilidad a los diferentes agonistas. No obstante, el receptor P2X7 presenta unas características estructurales y de señalización únicas

(Pelegrin, 2021), así como un mecanismo de activación poco claro (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). Estas particularidades fueron responsables de que el receptor P2X7 se considerara inicialmente como una nueva familia de receptores purinérgicos y, por lo tanto, se le dio el nombre de P2Z (en línea con la nomenclatura anterior de los receptores P2Y y P2X) para resaltar que era un tipo de receptor diferente. Sin embargo, después de su clonación en 1996, se descubrió que pertenece a la familia de receptores P2X y se le cambió el nombre a receptor P2X7 (Surprenant *et al.*, 1996).

La investigación sobre los mecanismos implicados en las vías de señalización del sistema purinérgico y, en particular, sobre este último receptor caracterizado (Gu *et al.*, 2000), continúa con las expectativas de entender y resolver numerosas patologías.

1.2. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7

El receptor P2X7 se considera atípico debido a una serie de razones. En primer lugar, este subtipo no forma heterómeros funcionales como lo hacen otros receptores P2X, sino que conforma preferentemente complejos homooligoméricos (Suh *et al.*, 2001). Además, mientras que los otros miembros de la familia P2X se activan con concentraciones de ATP en el rango de microMolar, el receptor P2X7 requiere concentraciones mucho más altas de ATP para su activación (incluso mM), que normalmente no se encuentran a nivel extracelular (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). De hecho, se han propuesto la existencia de moduladores alostéricos para este receptor (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020; Sluyter *et al.*, 2023) que permitiera incrementar la sensibilidad del receptor a concentraciones más bajas/fisiológicas de ATP, y así entender su significado biológico. Por último, tiene una secuencia C-terminal intracelular inusualmente larga, capaz de interactuar por palmitoilación con la bicapa lipídica interna de la membrana plasmática y así prevenir la desensibilización del receptor (Pelegrin, 2021) de forma que se da una actividad agonista prolongada.

En estudios previos, se han observado indicios de la presencia de receptores P2X7 funcionales en diversas células como mastocitos de rata, eritrocitos caninos, túbulos renales de conejo, astrocitos de hámster y fibroblastos murinos transformados por virus. Estos estudios han demostrado la activación de eventos inducidos por ATP extracelular con características típicas de los receptores P2X7, como la activación por altas concentraciones de ATP (>100 μ M) (Wiley *et al.*, 2011), la inhibición por Ca^{2+} o Mg^{2+} , y la sensibilidad a cambios de temperatura o pH (Sluyter, 2017). Aunque las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores P2X7 varían significativamente entre diferentes especies, el estudio de animales ha contribuido enormemente a la comprensión actual del P2X7 humano (Sluyter *et al.*, 2023).

En la actualidad, se ha establecido de manera sólida que los receptores P2X7 funcionales tienen una amplia distribución en prácticamente todos los tejidos y órganos del cuerpo humano (Wiley *et al.*, 2011; De Salis *et al.*, 2022). Principalmente, se encuentra en células de origen hematopoyético (Gu *et al.*, 2000) alcanzando su máxima expresión en las células del sistema inmunológico de origen monocito-macrófago (Wiley *et al.*, 2011). En relación con este hecho, se ha asociado con una amplia gama de trastornos relacionados con la inflamación, la inmunidad y la muerte celular y con patologías tan relevantes como trombosis, fibrosis, progresión tumoral y trastornos neuronales (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020).

1.2.1. Gen P2X7

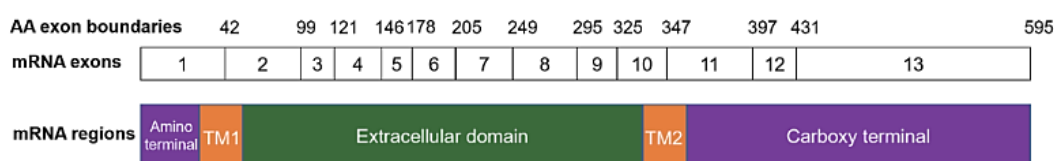
El gen P2X7R humano está compuesto por 13 exones (Figura 1A) y se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.31) (Buell *et al.*, 1998). Tiene una longitud de 53 kilobases (kB) y está centrómero-distal a otro miembro de la familia P2X, el P2X4R. La proximidad de P2X7 a P2X4 y la similitud en la secuencia de los dominios extracelulares y transmembrana sugieren que estos dos genes surgieron a partir de una duplicación (Wiley *et al.*, 2011).

Se ha encontrado el gen que codifica la subunidad P2X7R en al menos 55 especies. Además de los humanos, la subunidad P2X7R recombinante se ha caracterizado en otras seis especies de mamíferos: macaco, perro, panda, ratón, rata y cobayo. Estas especies comparten más del 75% de similitud con el P2X7R humano, mientras que, en especies no mamíferas, como el pez cebra, la similitud se reduce a menos del 40%. (Sluyter, 2017)

1.2.2. Proteína P2X7: estructura

Los receptores P2X son canales iónicos no selectivos activados por ligandos triméricos con una alta permeabilidad al Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Wang y Yu, 2016). La proteína P2X7 consta de 595 aminoácidos (aa). El monómero tiene un dominio N-terminal intracelular corto (26 aa), un dominio extracelular voluminoso (282 aa), dos hélices transmembrana (alrededor de 24 aa cada una) y una larga cola citoplasmática carboxi-terminal (239 aa) que es exclusiva de este subtipo de receptor (Figura 1A) (Di Virgilio *et al.*, 2017).

A)



B)

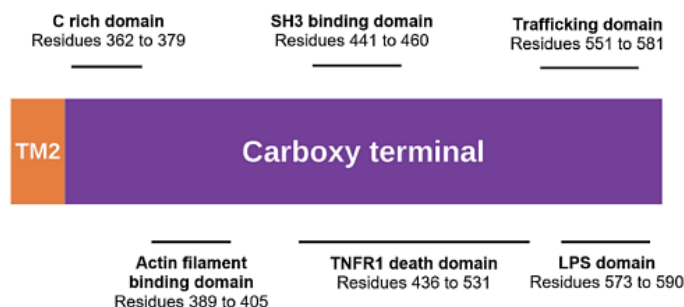


Figura 1. Estructura del ARNm codificante para proteína P2X7. (A) La estructura exónica del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) P2RX7 de longitud completa (exones 1 a 13) que codifica la subunidad P2X7A de 595 aminoácidos. Las regiones correspondientes de la subunidad P2X7A que se traducen del ARNm se ilustran debajo de la estructura exónica con los colores alineados con las regiones que se muestran. (B) Dominios de interés ubicados dentro del terminal carboxi de la subunidad P2X7A. (De Salis *et al.*, 2022)

Los terminales N y C intracelulares de las subunidades P2X7R desempeñan un papel importante en las funciones biológicas del receptor (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). El extremo N tiene un sitio específico para la proteína quinasa C y se cree que regula la desensibilización y la activación del receptor, además de controlar el flujo de calcio a través del canal. El extremo C, además de la formación del gran poro de conductancia, desempeña múltiples funciones clave (Figura 1B). Contiene motivos de unión a lípidos y proteínas que potencialmente interactúan con proteínas adaptadoras y/o efectoras en este dominio, incluido el epítipo de unión de *Sarcoma tyrosine kinase Homology 3* (SH3). Además, tiene un dominio de muerte similar al receptor 1 de TNF (TNFR1) que conduce a la activación de las caspasas que median la apoptosis y dominios implicados en el tráfico de receptores y la unión a proteínas del citoesqueleto. También posee un dominio de lipopolisacárido (LPS) para neutralizar la actividad endotóxica asociada al LPS. El carboxi-terminal es esencial para la formación del poro P2X7R y su función está regulada por la palmitoilación del dominio rico en cisteína y la unión a la membrana lipídica. Además, los últimos 120 aminoácidos del carboxilo terminal están involucrados en la dilatación de poros y en la transducción de señales citolíticas (De Salis *et al.*, 2022).

El P2X7 humano forma un receptor homotrímérico, rara vez se heterotrimeriza con otros receptores (Coddou *et al.*, 2011). La estructura tridimensional de las subunidades P2X7R se asemeja a la forma de un delfín, donde la región extracelular representa el cuerpo, y las dos hélices transmembrana (TM1 y TM2) representan la cola (Figura 2A, 2C).

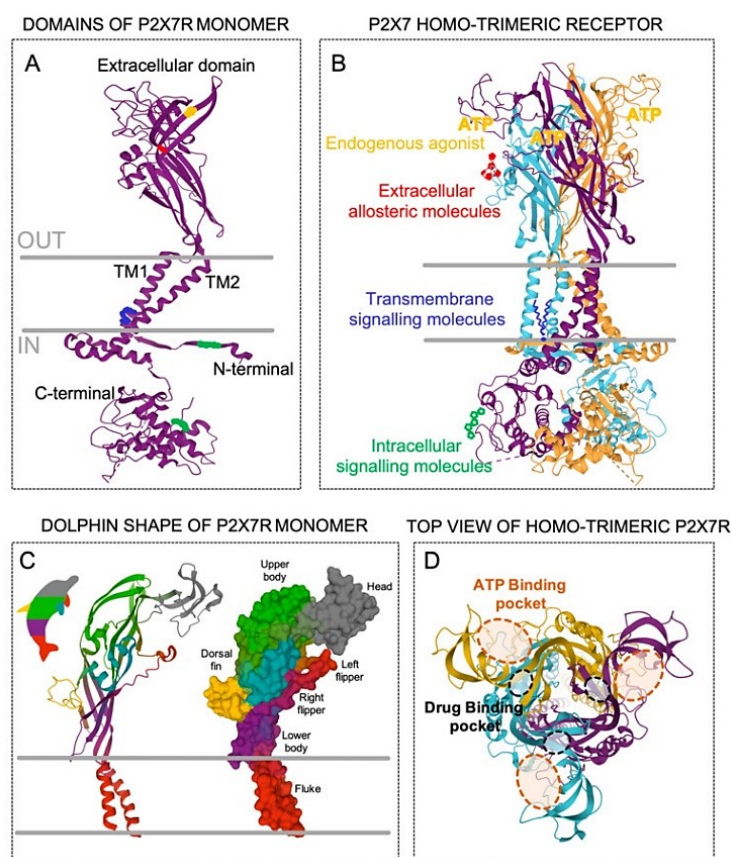


Figura 2. Topología del receptor P2X7 (P2X7R). (A) Estructura secundaria del monómero P2X7R con cinco dominios; extracelular, transmembrana 1 (TM1), transmembrana 2 (TM2), N-terminal intracelular y C-terminal intracelular. Los colores en los dominios representan posibles sitios de reconocimiento molecular específicos. (B) Coensamblaje de los tres monómeros P2X7R (púrpura, azul y naranja) en la posición del receptor trimérico que muestra posibles moléculas circundantes que podrían interactuar con los diferentes dominios. (C) El monómero P2X7 representado como estructura secundaria (izquierda) y estilos de superficie molecular (derecha) que se asemejan a un delfín. (D) Vista superior de la estructura P2X7R que abarca los tres bolsillos extracelulares de unión a ATP (líneas discontinuas naranjas) y los tres bolsillos adicionales de unión a fármacos (líneas discontinuas negras). (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020)

El receptor activo está conformado por tres bolsillos de unión a su agonista endógeno (ATP), suministrados por los sitios de ATP de cada par de dos monómeros adyacentes (Figura 2D) (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). En el modelo atómico del P2X7R, se ha identificado un total de nueve residuos de aminoácidos que participan en los sitios de unión de ATP. Estos residuos incluyen LK64, K66, T187, K197, Q292, R294, K311, K127, K145, R276, R277 y N284 (De Salis *et al.*, 2022). Además de los sitios de unión a ATP, se han identificado tres bolsillos de unión a fármacos cercanos a los sitios de ATP (Figura 2D). Estos bolsillos se adaptan a diferentes compuestos con propiedades inhibitoras y/o moduladoras alostéricas del P2X7R, como péptidos, fármacos, antibióticos y derivados de plantas (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020).

1.2.3. Activación del receptor

El receptor P2X7R se describe ampliamente como un receptor de superficie celular en el que el ectodominio está expuesto extracelularmente (Sluyter, 2017; Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). Hasta

la fecha, se ha descrito que la activación de P2X7R requiere altas concentraciones extracelulares de ATP (EC50~50 μ M a 2,5 mM) (Urbina-Treviño *et al.*, 2022). Debido a que la mayor parte del ATP se encuentra intracelularmente, la liberación de ATP requiere relevancia, pues puede ocurrir de manera no regulada debido a la ruptura de la membrana en células dañadas o muertas, pero también puede ser liberado de manera controlada a través de canales de membrana, como las conexinas y las panexinas. Las altas concentraciones de ATP (> 1mM) necesarias para activar el receptor tienen consecuencias importantes, ya que pueden llevar a la muerte celular o muerte celular retardada (pseudopoptosis) dependiendo de la duración de la exposición al ATP. Así mismo, las concentraciones más bajas (< 1mM), pueden tener el efecto contrario, estimulando la proliferación y prolongando la supervivencia celular. (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020)

La rápida degradación del ATP extracelular en AMP y adenosina, mediada por las enzimas CD39 y CD73, respectivamente, representa otro obstáculo para la existencia de altas concentraciones de ATP en el entorno extracelular. Sin embargo, surge la hipótesis que la co-localización específica del receptor P2X7R en la membrana celular cerca de los sitios de liberación de ATP (como los canales de membrana) y a cierta distancia de las enzimas de degradación podría justificar la presencia de una alta concentración extracelular de ATP suficiente para activar el receptor P2X7. Esta característica de co-localización podría variar en cada tejido y especie estudiada, lo que sugiere una modulación específica en relación a la activación de este receptor en distintos contextos biológicos (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020).

El receptor P2X7R presenta una inusual inespecificidad tras la activación por concentraciones altas de ATP que no es común en receptores inotrópicos o el resto de P2X. La unión del ATP al receptor provoca una serie de cambios conformacionales que resultan en la apertura rápida de un canal iónico (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). De forma que la activación repetida o prolongada, en el caso de altas concentraciones de ATP, da como resultado un aumento irreversible en la permeabilidad de la membrana al formar un "poro grande" no selectivo (Savio *et al.*, 2018; Pelegrin, 2021) que permite que moléculas hidrofílicas de hasta 900 Da pasen a través de la membrana celular (De Salis *et al.*, 2022). Por lo tanto, la pérdida de las moléculas esenciales para la célula puede provocar la muerte celular o apoptosis, que es una de las posibles funciones de este receptor. El hecho que este receptor tenga zonas de modulación alostérica sugiere que en presencia de modulador endógeno, hasta la fecha desconocido, se podría incrementar la sensibilidad al ATP en condiciones fisiológicas regulando funciones específicas y diferentes a la señal de muerte celular (Coddou *et al.*, 2011; Sluyter, 2017; Martínez-Cuesta *et al.*; 2020). Se han propuesto diversos moduladores alostéricos como cationes divalentes, fosfoinositidas, glicosaminoglicanos entre otras moléculas. Por ejemplo, el LPS que se encuentran en las membranas externas de las bacterias, podrían amplificar la respuesta del receptor al interactuar con un dominio específico en su extremo carboxi-terminal apoyando un vínculo cada vez más claro entre el P2X7R y la respuesta inmune (Martínez-Cuesta *et al.*; 2020).

Además, las investigaciones sobre los mecanismos de apertura del poro del P2X7R se han realizado en células HEK-293 transfectadas con receptor P2X7 de rata y P2X7 humano (Jiang *et al.*, 2005; Schachter *et al.*, 2008; Cankurtaran-Sayar *et al.*, 2009; Marques-da-Silva *et al.*, 2011; Browne *et al.*, 2013), por lo que es relevante considerar que estos hallazgos pueden no ser aplicables a todos los tejidos y especies, incluidos los seres humanos. La investigación futura deberá explorar cómo se comporta el receptor P2X7R en diferentes contextos biológicos y en tejidos humanos para una comprensión más completa de su función y regulación. (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020).

1.3. DIVERSIDAD DEL RECEPTOR P2X7

1.3.1. Polimorfismos

En humanos, el receptor P2X7 presenta diferentes variantes de empalme y polimorfismos que pueden afectar su activación (Pelegrin, 2021). El receptor P2X7 humano es altamente polimórfico

(Sluyter, 2017). Se han identificado más de 150 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el bucle extracelular y en el dominio C-terminal (Di Virgilio *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2013; Roger *et al.*, 2010; Fuller *et al.*, 2009). Lo que significa que hay un cambio en la secuencia de los aminoácidos, generando una mutación puntual (Andrejew *et al.*, 2020).

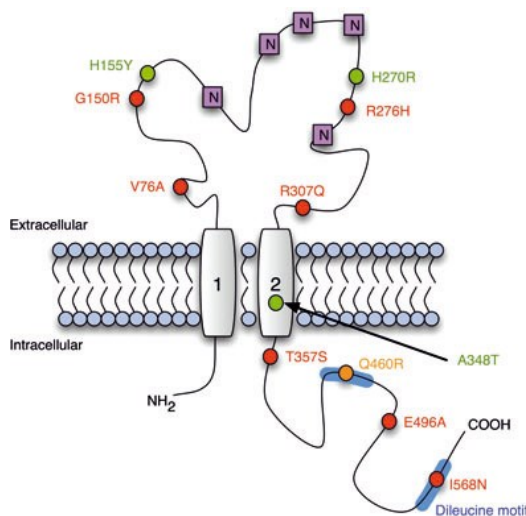


Figura 3. Sitios polimórficos en la secuencia primaria del receptor P2X7. El código de colores identifica las variantes de pérdida de función (rojo) y las variantes de ganancia de función (verde). Las regiones con motivos de dileucina están sombreadas en azul. Los sitios de N-glicosilación se muestran en cuadros morados. (Wiley *et al.*, 2011)

En las poblaciones caucásicas, la combinación de los diferentes SNP del receptor P2X7 genera una genética compleja de cinco haplotipos principales diferentes que se pueden subdividir en 17 haplotipos. El haplotipo 1 se define como el receptor P2X7 de tipo salvaje, mientras que los haplotipos 2 y 4 son de ganancia de función (principalmente debido al SNP A348T) y los haplotipos 3 y 5 son de pérdida de función (debido a los SNP E496A y T357S) (Figura 3) (Pelegrin, 2021; Schäfer *et al.*, 2022).

Algunas de esas mutaciones están relacionadas con la susceptibilidad alterada a diversas enfermedades (Andrejew *et al.*, 2020). Los estudios de asociación genética han encontrado que los SNP del receptor P2X7 están asociados con una mayor probabilidad de desarrollar trastornos del estado de ánimo (como el síndrome bipolar o la depresión) y con infecciones por el virus del herpes humano 6A y patógenos intracelulares como la tuberculosis (Wiley *et al.*, 2011; Pelegrin, 2021).

1.3.2. Variantes de *splicing*

En particular, se han encontrado once variantes de empalme para el P2X7 humano, las primeras diez se denominaron P2X7A a P2X7J con P2X7L como la undécima, pero la expresión de proteínas endógenas solo se ha informado para P2X7A (el receptor P2X7 común de longitud completa (Wiley *et al.*, 2011), P2X7B, P2X7H y P2X7J (Pelegrin, 2021).

Los mecanismos que subyacen a la diversidad de respuestas del receptor P2X7 aún son desconocidos. Se ha planteado la hipótesis de que el empalme alternativo, que permite la producción de múltiples isoformas de un gen, puede generar isoformas P2X7 empalmadas alternativamente que participan en roles celulares variables al alterar la estructura y función del receptor P2X7R (Figura 4) (De Salis *et al.*, 2022; Ciruela & Jacobson, 2023).

Hasta ahora, solo se ha caracterizado completamente la isoforma P2X7B en estudios funcionales. Aunque P2X7B muestra actividad de canal estimulada por ATP cuando se transfecta en células HEK-293, no puede formar un poro homotrimérico por sí sola. Se ha demostrado que P2X7B se ensambla junto con P2X7A en un heterotrimero que potencia las respuestas de P2X7 ante el ATP, incluyendo la formación de canales, poros y vesículas en la membrana (Wiley *et al.*, 2011).

Además, se han detectado variantes de empalme que dan lugar a receptores que carecen de la cola citoplasmática, lo cual podría explicar la reducción de las funciones de P2X7 en algunos tejidos normales, así como en células tumorales que sobreexpresan esas variantes y antagonizan la función de la variante normal (Wiley *et al.*, 2011).

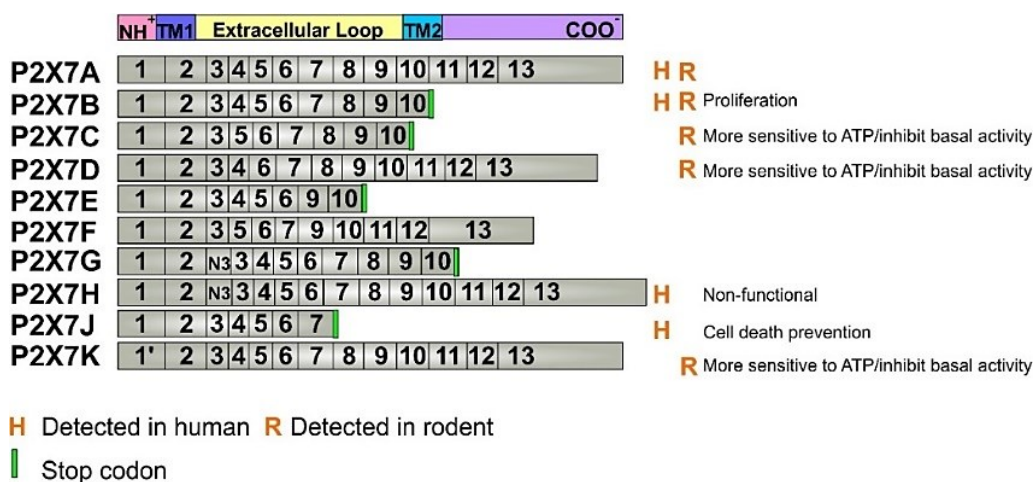


Figura 4. Variantes de empalme del receptor P2X7. Se representan 10 isoformas diferentes derivadas de splicing alternativo y mutaciones de los 13 exones del gen. La isoforma P2X7A es la forma nativa, expresada en todas las especies de mamíferos. Las isoformas alteradas detectadas en humanos son P2X7B, H y J, mientras que en roedores son P2X7B, C, D y K. Las mutaciones que conducen a la inserción de un codón de parada originan un receptor P2X7 acortado en el dominio carboxi-terminal y no pueden formar poros que inducen la muerte celular. P2X7G y H presentan una copia del exón 3 (N3) cerca del amino terminal. Las funciones básicas conocidas para cada isoforma se describen en el sitio derecho del panel. (De Salis *et al.*, 2022)

1.3.3. Modificaciones postraduccionales

El receptor P2X7 sufre cambios después de ser sintetizado. En concreto, es objeto de modificaciones postraduccionales que incluyen glicosilación ligada a N, palmitoilación y ribosilación de ADP. Tanto las subunidades P2X7 humanas como las de roedores se glicosilan, lo que resulta en productos proteicos de un tamaño típico de 75 a 78 kDa en comparación con el tamaño no glicosilado previsto de 68 kDa (Sluyter, 2017).

Se han identificado varias modificaciones postraduccionales en el dominio extracelular P2X7; estos incluyen la ribosilación de ADP en un lugar específico (R125 en ratones) que está involucrada en la activación del receptor murino (Lara *et al.*, 2020) y en el caso del receptor P2X7 humano, se glicosila en cinco lugares específicos de aminoácidos (N187, N202, N213, N241 y N284). La glicosilación en estos sitios, especialmente en N187, facilita la colocación del receptor en la superficie de la célula y su función posterior (Sluyter, 2017; Lara *et al.*, 2020). En los receptores P2X7 de otras especies, se conservan estos cinco lugares de glicosilación, excepto el residuo N284 en la subunidad P2X7 de ratones, donde se encuentra un residuo diferente. Sin embargo, la mutación de N284 a un residuo específico en ratones aumenta el peso molecular del receptor, lo que indica que N284 también es un sitio de glicosilación (Sluyter, 2017). Además, la fosforilación del Y343 también regula la activación del canal, lo que enfatiza la importancia de estos residuos durante la activación del receptor (Lara *et al.*, 2020). Además, una mutación natural (R578Q) que afecta la glicosilación en el extremo C del receptor P2X7 humano produce un receptor con un mayor peso molecular y función alterada, lo que sugiere que el extremo C también juega un papel en la glicosilación y el tráfico del receptor (Sluyter, 2017).

Otra modificación importante es la palmitoilación de residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal del receptor. Para que el receptor P2X7 se exprese en la superficie celular y funcione correctamente, al menos ocho o nueve de los 17 residuos de cisteína en la cola citoplasmática

deben ser palmitoilados (Wiley *et al.*, 2011). Esta palmitoilación también afecta la desensibilización del receptor (McCarthy *et al.*, 2019).

La región rica en cisteína al comienzo de la cola C-terminal del receptor es palmitoilada en al menos cinco residuos (C362, C363, C374, C377 y S360), y esto juega un papel esencial en el tráfico del receptor hacia la membrana celular (Wiley *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2020) y en la prevención de la desensibilización del receptor (McCarthy *et al.*, 2019; Lara *et al.*, 2020).

1.4. PAPEL DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 EN LA TROMBOINFLAMACIÓN

Actualmente se ha descrito que el receptor P2X7 desempeña un papel importante en la inflamación y está implicado en enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis y la trombosis (Blanch-Ruiz *et al.*, 2023). Recientemente, ha surgido el término "trombo-inflamación" debido a la estrecha conexión entre ambos términos, que ha tenido su punto más álgido en la COVID-19, y donde se ha descrito la importante interacción entre los leucocitos y las plaquetas (Franco *et al.*, 2015). El proceso inflamatorio como respuesta a un estímulo de daño o infección conlleva la activación del neutrófilo, capaz de liberar numerosos mediadores pro-inflamatorios (citoquinas, ROS, etc..) y protrombóticos (NETs, microvesículas...) que a su vez amplifican y diversifican la señal entre los propios leucocitos y activando a otras células como el endotelio vascular o las plaquetas (Díaz, 2018; Linden *et al.*, 2019).

Casi todas las células de mamíferos, incluidas las células mieloides, las plaquetas, los leucocitos, las células epiteliales y endoteliales, pueden liberar ATP, que luego puede conducir a la activación paracrina o autocrina de la señalización purinérgica y la exacerbación de la respuesta inflamatoria (Karmakar *et al.*, 2016).

1.4.1. El neutrófilo

Los neutrófilos polimorfonucleares son un tipo de leucocitos que se reclutan en sitios inflamatorios y desempeñan un papel fundamental en la eliminación de patógenos (Mollinedo *et al.*, 1999; Martel-Gallegos *et al.*, 2010). Se ha descrito que la activación de los receptores P2X7 por el ATP desencadena la activación de neutrófilos humanos y murinos que, a través del inflammasoma NLRP3, producen la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-18 (figura 5) (Karmakar *et al.*, 2016), adhesión a células endoteliales (Martel-Gallegos *et al.*, 2010; Muschter *et al.*, 2015), liberación de trampas extracelulares (NETs) para capturar microbios y limitar su propagación (Kolaczowska y Kubes, 2013), así como producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) para su destrucción (Martel-Gallegos *et al.*, 2010). Además de su función defensiva, se ha descubierto que también desempeñan un papel en la formación de trombos y pueden contribuir a la formación de "inmuntrombos", una red de andamios que atrapan partículas microbianas y están relacionados con la respuesta inmunitaria y la trombogénesis (Franco *et al.*, 2015).

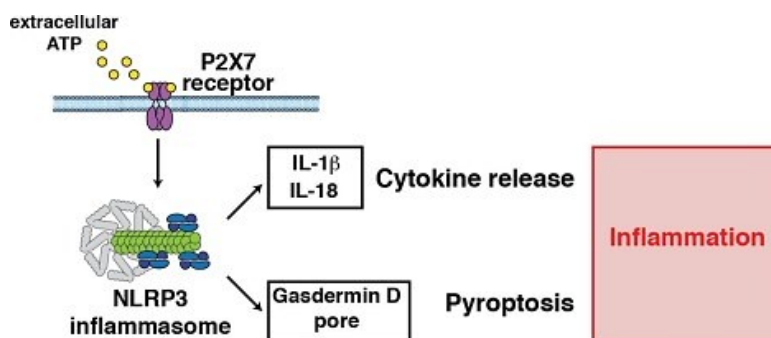


Figura 5. Activación del inflammasoma NLRP3 por el receptor P2X7 y liberación de citoquinas. (Pelegrin, 2021)

Los neutrófilos, como la primera línea de defensa contra patógenos invasores y en la patogénesis de enfermedades no infecciosas, exhiben respuestas rápidas y funciones a largo plazo determinadas por la expresión génica y la síntesis de proteínas. Estas respuestas están mediadas por rutas de señalización específicas que implican alteraciones en la fosforilación de moléculas de señalización. El análisis del fosfoproteoma, o conjunto de proteínas que sufren la modificación post-traducciona l de fosforilación (López Villar *et al.*, 2008), se ha utilizado para comprender mejor los mecanismos fisiológicos y patológicos de los neutrófilos. Sin embargo, los análisis de proteomas en neutrófilos son desafiantes debido a la presencia de proteasas endógenas. (Muschter *et al.*, 2015)

En cuanto a la expresión de los receptores P2X7 en los neutrófilos humanos no está claramente establecida (Vaughan *et al.*, 2007) y, de hecho, los informes sobre la expresión de P2X7R y su función en los neutrófilos humanos y murinos son contradictorios (Karmakar *et al.*, 2016). Por otro lado, algunos estudios han detectado ARNm de receptor P2X7, P2X1 y P2X4 en neutrófilos humanos, mientras que otros no encontraron evidencia de ARNm o proteínas en neutrófilos completos (Karmakar *et al.*, 2016; Vaughan *et al.*, 2007). Incluso en condiciones estimuladas como con el tratamiento de neutrófilos con lipopolisacárido (LPS), que se sabe que aumenta la expresión de P2X7R en los monocitos, no se indujo la expresión de la proteína P2X7 (Martel-Gallegos *et al.*, 2010). También se han obtenido resultados no concluyentes con células HL-60 diferenciadas con dimetilsulfóxido (DMSO), una línea celular ampliamente utilizada como modelo de neutrófilos. En estas células, se han informado tanto la regulación al alza de P2X7R como la regulación a la baja de los niveles de ARNm de P2X7R tras el tratamiento con LPS (Martel-Gallegos *et al.*, 2010; Karmakar *et al.*, 2016).

Por último, mencionar que los esfuerzos para establecer el papel funcional de los receptores P2X7 en los neutrófilos se complican por la expresión de al menos 250 formas polimórficas del receptor y por la falta de activadores específicos (Martel-Gallegos *et al.*, 2010). Por todo ello, localizar la proteína P2X7 nativa en condiciones basales en neutrófilos humanos es un buen punto de partida para entender su activación y función específica de este receptor en el neutrófilo.

1.4.2. La plaqueta

Las plaquetas, también llamadas trombocitos, son células pequeñas y anucleadas con forma de disco que se originan a partir de megacariocitos en el linaje hematopoyético (Fagua, 2022). Desempeñan un papel crucial en la hemostasia normal (Franco *et al.*, 2015; Hechlery, 2015) y en la formación de trombos patológicos, tras la adhesión al endotelio (Blanch-Ruiz *et al.*, 2023), que pueden obstruir los vasos sanguíneos. Aunque carecen de núcleo, son metabólicamente activas y contienen retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias. Su membrana compleja contiene diversos receptores y moléculas de adhesión que participan en la adhesión, activación y agregación plaquetaria (Fagua, 2022). Además, las plaquetas albergan diferentes tipos de gránulos y vesículas que liberan moléculas reguladoras tras la activación. Se ha encontrado que expresan niveles bajos de ARNm, derivado de su célula progenitora, el megacariocito, y se ha demostrado que las plaquetas activadas pueden traducir ARNm constitutivo en proteínas. Sin embargo, no pueden producir nuevo ARNm debido a la falta de núcleo (Wang, 2003).

Los receptores purinérgicos mayoritariamente localizados en las plaquetas son los receptores P2Y12 y P2Y1 activados por ADP, y el receptor P2X1 activado por ATP. No hay duda de la participación de los receptores P2Y plaquetarios en la trombosis, pero hay poco consenso sobre la función específica del receptor P2X1 (Wong *et al.*, 2022). Asimismo, se han mencionado la existencia de otros receptores purinérgicos, cuyo nivel de expresión en plaquetas es extremadamente prácticamente nulo, y de los cuales se desconoce su función como son los receptores; P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13, P2X4 y P2X7 (Wang, 2003). En concreto, existen escasos estudios sobre el receptor P2X7 en plaquetas humanas, y aún menos sobre su función. Por ello, al igual que en neutrófilos, detectar la proteína P2X7 nativa en condiciones basales en plaquetas humanas es un buen punto de partida para entender su significado biológico.

1.4.3. El endotelio vascular

El endotelio vascular es un tejido compuesto por células endoteliales que forman una monocapa continua que separa la sangre del tejido subendotelial (Díaz, 2018), altamente especializado y activo metabólicamente que regula diversas funciones vasculares, incluyendo el tono vascular, la adhesión celular, la permeabilidad y la hemostasia normal frente a la trombosis y la inflamación mediante mediadores autocrinos y paracrinos (Díaz, 2018; Ozen *et al.*, 2020). Una consecuencia del daño de las células endoteliales y la lisis en el sitio de la inflamación es el aumento de ATP en el espacio extracelular (Sathanoori *et al.*, 2015). Esto lleva a una alteración del equilibrio entre mediadores vasodilatadores/antitrombóticos (óxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado del endotelio), vasoconstrictores /protrombóticos (endotelina 1, angiotensina II, tromboxano) en el endotelio que afectará a la homeostasis vascular (Sandoo *et al.*, 2010).

Anteriormente se creía que las HUVEC carecían de expresión del receptor P2X7R. Sin embargo, Valdecantos *et al.* (2003) demostraron que este receptor está presente y funcional en la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos de la placenta, incluyendo el corion materno y la vena y arteria umbilical fetal. Wilson *et al.* (2007) confirmaron la presencia de receptores P2X7R en HUVEC durante el estudio, y la exposición a la inflamación demostró que estas células eran capaces de secretar IL-1 β a través del mecanismo dependiente de P2X7R.

1.5. CONTROVERSIA RESPECTO AL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7

Existen pocos artículos en la bibliografía que hayan detectado la forma nativa del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas en condiciones basales. Como se observa en la tabla 1, la mayoría de los artículos que detectan el receptor lo hacen con técnicas de PCR, localizan el ARNm, pero los autores que lo detectan incluso sugieren que la pequeña detección del mensajero pueda provenir de otros tipos celulares como células mononucleares sanguíneas (linfocitos, monocitos...). Más escasos son los estudios que muestran el Western blot de dicho receptor. En concreto, dos de ellos lo hacen, pero una vez revisados detenidamente nos plantean dudas en cuanto al anticuerpo utilizado. En plaquetas humanas, la situación respecto a los artículos publicados es incluso más pobre que en los neutrófilos. Además, Gu *et al.* (2000) sugiere que la mayoría de los P2X7R se encuentran en el citosol de los neutrófilos humanos y sirven como reserva para ser reclutados en la membrana plasmática después de la activación celular, de esta forma, se estaría desestimando la hipótesis de que el receptor se localice en la membrana celular. Además, habría que considerar las variantes polimórficas del receptor P2X7 descritas en este gen, que se han relacionado con diferencias cuantitativas o cualitativas en la función del receptor P2X7 en ratones y en humanos (Karmakar *et al.*, 2016).

Ante esta controversia respecto a la detección de este receptor en la naturaleza, junto con sus características atípicas y particulares, consideramos que localizar el receptor en su forma nativa, sin estímulos y en el entorno celular específico de cada tipo celular es un buen punto de partida para entender su función y su significado biológico. Hay que tener en cuenta que la existencia de posibles isoformas diferentes en cada tipo de célula (animal o humana), o incluso una misma isoforma del receptor en un entorno celular diferente (neutrófilo o plaqueta) podría conformar grandes diferencias.

Tabla 1. Artículos que han testado la existencia del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas.

Tipo celular	Referencia del artículo	Técnica	Anticuerpo empleado	Detección del receptor P2X7
PMNs	Martel-Gallegos <i>et al.</i> , 2010	PCR		Detectado (transcritos) pero de posible contaminación
		Western blot	APR-008, APR-008-F y APR-004	No detectado por anticuerpos -int y -ext anti-P2X7
	Vaughan <i>et al.</i> , 2007	PCR		Detectado intermitentemente, pero por posible contaminación
		Western blot	APR-008	No detectado ni en condiciones basales ni tras tratamiento con LPS
	Karmakar <i>et al.</i> , 2016	Western blot	APR-004 (C-terminal) y APR-008 (ectodominio)	Detectado en neutrófilos no estimulados y cebados con LPS
	He <i>et al.</i> , 2022	Western blot	Anticuerpos policlonales de conejo anti-P2X7 (ORIGENE)	Detectado en neutrófilos incubados con <i>C. psittaci</i> durante 24 h y usando β -actina como control de carga.
	Chen <i>et al.</i> , 2004	PCR		Detectado
	Suh <i>et al.</i> , 2001	PCR		Detectado
	Mohanty <i>et al.</i> , 2001	PCR		No detectado
Plaquetas	Wong <i>et al.</i> , 2022	Western blot	Anticuerpo policlonal de oveja antihumano P2X7 sintetizado por los propios investigadores	Detectado
	Wang, 2003	PCR		Detectado. Expresión extremadamente baja.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es detectar la forma nativa del receptor purinérgico P2X7 en neutrófilos y en plaquetas humanas.

Los objetivos específicos:

- Optimizar metodológicamente las técnicas de aislamiento de neutrófilos y plaquetas, así como la extracción proteica de las mismas, para obtener el máximo rendimiento en la detección del receptor P2X7.
- Detección por Western blot del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas en condiciones basales, y valorar la existencia de posibles isoformas diferentes del receptor mediante el uso de dos anticuerpos anti-P2X7 dirigidos a diferentes epítomos de la proteína del receptor P2X7.
- Analizar la influencia del agonista endógeno del receptor P2X7 (ATP), de estímulos inflamatorios (LPS) y fibróticos (TGF- β 1) sobre la expresión del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas.
- Detectar el gen del receptor P2X7 en neutrófilos humanos en condiciones basales y con los estímulos descritos (ATP, LPS y TFG- β 1).

Además, el presente trabajo se alinea con los objetivos de la agenda 2030: ODS 3. Salud y bienestar y, ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras con un grado de relación alto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Para la realización de este trabajo experimental se emplearon dos tipos de muestras humanas. Por un lado, se emplearon células endoteliales. Estas células fueron extraídas de cordones umbilicales donados por madres sanas del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Por otro lado, se empleó sangre procedente de donantes sanos del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana. Dichos donantes no deberían haber tomado ningún AINE (Medicamento Antiinflamatorio No Esteroide) durante las dos semanas previas a la dicha extracción y la sangre fue recogida en tubos de sangre cuyo anticoagulante fue el citrato sódico. Con la sangre se procedió a la extracción de neutrófilos y plaquetas.

Los donantes de sangre del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana firmaron un consentimiento informado. Además, el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia aprobó el proyecto dentro del cual se enmarca este estudio in vitro con muestras de cordón umbilical. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado.

La toma de muestras no fue excluyente en cuanto a diferencias en el sexo, raza o etnia entre los diferentes grupos.

3.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO CELULAR

3.2.1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de la vena de cordón umbilical (HUVEC)

Para la obtención de HUVEC, se procedió a realizar el método de la colagenasa. La vena del cordón se lavó por el interior con tampón fosfato salino (PBS) (20012068, Gibco™) se introdujo colagenasa disuelta en PBS (1 mg/ml) y se mantuvo a 37°C y 5% CO₂ durante 17 minutos en el incubador. Una vez finalizado el periodo de incubación, se llevó a cabo un ligero masaje para garantizar la separación de las HUVEC de la pared del vaso y se recogió el contenido en un tubo cónico de 50 mL apto para centrifuga que se centrifugó 5 minutos a 20°C y 1100 rpm. El pellet de células obtenido se resuspendió en 5 mL de EBM™-2 Basal Medium (CC-3156, Lonza Bioscience) completo y se llevó a un flask T-25 que, posteriormente se llevó a incubar en condiciones óptimas de crecimiento (37°C y 5% CO₂).

Para la realización de experimentos con células HUVEC se trabajó en pase 1. Para ello, una vez alcanzado el 100% de confluencia en el flask de cultivo T-25, las células se pasaron a una placa de cultivo de 6 pocillos (pase 2). Para ello, el flask se lavó con PBS, se incubaron las células primarias con tripsina durante 2 minutos en el incubador añadiendo inmediatamente el medio con suero para neutralizar y se recogió la solución celular en un tubo cónico de 50 ml. Se centrifugó 5 minutos 1200 rpm y el pellet fue resuspendido en medio EMB-2 obteniendo un volumen del cual fueron necesarios 2 ml en cada pocillo para la siembra en placa. Las células se mantienen en el incubador a 37°C, en atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO₂.

3.2.2. Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) a 37°C y a 4°C

En un tubo cónico de 50 mL, se vertió el contenido de 6 tubos de sangre (aproximadamente 27 mL de sangre) y se adicionó solución de dextrano 3% (31392, Sigma-Aldrich) a razón de 10 mL por cada 20 mL de sangre, mezclando por inversión. Se mantuvo la mezcla en reposo durante 45 minutos con el propósito de conseguir la separación de fases por gradiente de densidad. Transcurrido ese tiempo, se añadió 15 mL de Ficoll-Paque™ Plus (GE17-1440-03, Cytiva) en un tubo cónico de 50 mL apto para centrifuga. Se recogió la fase amarillenta y se depositó gota a gota sobre el Ficoll-Paque sin que se mezclen. Se centrifugó 25 minutos a 1800 rpm.

Finalizada la centrifugación, los PMNs quedan en el sedimento junto con los eritrocitos por lo que se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de solución de lisis (NH_4Cl , NaHCO_3 , $\text{EDTA}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) durante 5 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm (Figura 6). Este paso se debe repetir una vez más si el pellet continúa teniendo eritrocitos que no han sido lisados por completo. Se lavó el sedimento con 5 mL de solución salina equilibrada de Hank (HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) (H6648, Sigma-Aldrich) y se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm.

El sedimento obtenido fue resuspendido en 3 ml de medio RPMI-1640 completo (21875034, Gibco™). Y, por último, se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer a una dilución 1:100.

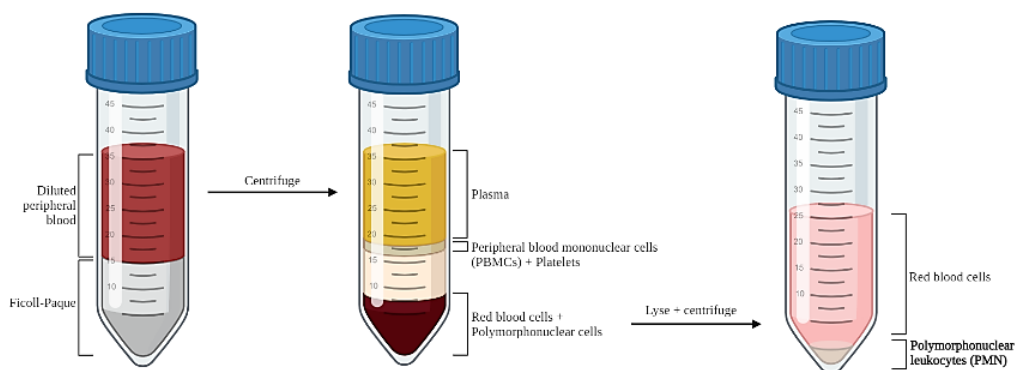


Figura 6. Procedimiento de aislamiento de PMNs. Adaptado de “Isolate Cells from Blood”, por BioRender.com (2023). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

3.2.2.1. Modificaciones del protocolo

Se probaron dos tipos de métodos de aislamiento:

- **A temperatura ambiente.** No se aplicaron modificaciones más allá de asegurarse que se cumplieran condiciones de temperatura ambiente en todos los pasos. Se debe asegurar que la centrífuga está a 20°C.
- **En frío.** Todo el procedimiento se realizó en hielo asegurando que la centrífuga estaba a 4°C. Además, se modificó el protocolo de forma que, en este caso, se lavó el sedimento celular con 5 mL de PBS suplementado con tableta cOmplete Mini® (11836153001, Roche Diagnostics).

3.2.3. Aislamiento de plaquetas

En un tubo cónico de 50 mL apto para centrífuga se vertió el contenido de 4 tubos de sangre (aproximadamente 18 mL de sangre) y se centrifugó la sangre a 1100 rpm durante 20 minutos. Finalizada la centrifugación, se recogió el sobrenadante (PRP o plasma rico en plaquetas) con cuidado en un tubo de 15 mL. El PRP recogido, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante (PPP o plasma pobre en plaquetas) (Figura 7). Se procedió con el lavado de las plaquetas añadiendo solución de lavado 10mM HEPES (H3784, Sigma-Aldrich) Tyrode (T2397, Sigma-Aldrich) al sedimento de plaquetas. Se resuspendió con mucho cuidado evitando al máximo la activación de las plaquetas. Posteriormente, se centrifugaron las plaquetas lavadas a 2000 rpm durante 10 minutos y finalmente, se retiró el sobrenadante y se congeló el pellet a -80°C.

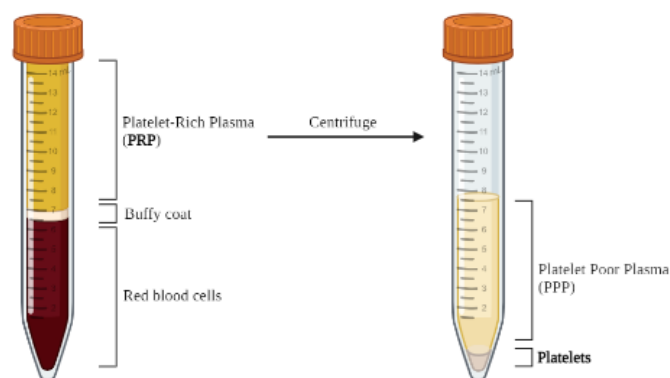


Figura 7. Procedimiento de aislamiento de plaquetas. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com/).

3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO

Por una parte, los diferentes tipos celulares fueron recogidos sin ser tratados, en condiciones basales.

Por otra parte, los distintos tipos celulares fueron tratados de manera independiente con los estímulos o vehículos indicados en la tabla 2 durante 4 h a 37°C. En el caso de las HUVEC, fueron tratadas en placas de 6 pocillos cuando alcanzaron el 95% de confluencia. Los PMNs fueron tratados en el último paso de aislamiento, una vez se ajustado el número de neutrófilo a x / ml de medio RPMI. Las plaquetas fueron tratadas cuando estaban en el PRP.

Tabla 2. Estímulos pro-inflamatorios y pro-fibróticos empleados en PMNs, HUVEC y PRP.

Tratamiento	Concentración utilizada
TFG-β1 (3876853, Sigma-Aldrich)	5 ng/ml
LPS (L4391, Sigma-Aldrich)	500 ng/ml
ATP (A26209, Sigma-Aldrich)	4 mM
Vehículos: H₂O destilada estéril y filtrada (J60610.EQC, ThermoFisher Scientific) Solución salina estéril y filtrada (S0817, Sigma-Aldrich)	

3.3.1. Recogida de las células

Las HUVEC fueran levantadas de los pocillos con tripsina 2 min a 37°C y tras neutralizar la tripsina con medio EMB-2, los re-suspendidos celulares se centrifugaron 5 min a 1200 rpm. El pellet fue lavado con PBS y tras una segunda centrifugación, el pellet de HUVEC fue inmediatamente congelado a -80°C.

Los PMNs tratados se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm, se lavaron con PBS y se volvió a centrifugar 5 min a 1200 rpm para recoger el pellet que se congeló inmediatamente a -80°C.

Respecto a las plaquetas, al haber tratado el PRP se debe continuar con el protocolo de lavado y aislamiento de plaquetas mencionado anteriormente.

3.4. WESTERN BLOT

El Western blot, también conocido como immunoblotting se utilizó para identificar la expresión del receptor purinérgico P2X7 a nivel proteico.

3.4.1. Obtención de extractos proteicos

El pellet celular tratado, previamente congelado a -80°C , se descongeló con el propósito de llevar a cabo la extracción de las proteínas mediante el empleo de dos soluciones de lisis diferentes de la siguiente composición:

- **B1** compuesto por tableta cOmplete Mini® y Phosphosafe™ Extraction Reagent (71296-3, Sigma-Aldrich) a la dilución 1:10
- **B2** (Tris-HCl 50mM pH 7,8, NaCl 137 mM, EDTA 1mM, NaF 10mM, β -glicerofosfato 10mM, Na ortovanadato 1mM, Triton X-100 1%, lauroil sarcosinato de sodio 0,2%, glicerol 10%) suplementado con tableta cOmplete Mini®.

Seguidamente, se vortearon las muestras antes y después de dejarlas incubar en hielo durante 10 min. Finalmente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C . El sedimento se desechó y se recogió el sobrenadante proteico de cada una de las muestras en un eppendorf.

Los volúmenes de buffer de lisis utilizado son optimizados al tipo celular. Este será distinto según el número de células que haya en el sedimento: 120 μL para PMNs 150 μL para plaquetas y 40 μL para HUVEC,

3.4.2. Cuantificación de proteína: ensayo Ácido Bicinonónico (BCA)

Para la cuantificación de proteínas presentes en nuestro extracto celular se empleó el ensayo del BCA. Este ensayo se basa en la reacción de reducción de Biuret que consiste en el paso de iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuproso (Cu^{+}) producida por las proteínas en condiciones alcalinas. Estos iones reaccionan con el BCA observándose una coloración morada en los pocillos. La reacción se ve considerablemente afectada por cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) presentes en la secuencia de aminoácidos de la proteína (THERMOFISHER.COM, n.d.).

Para llevar a cabo la cuantificación, se empleó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Reagent (23227, ThermoFisher Scientific). Se elaboró una recta patrón empleando seroalbúmina bovina (BSA) (C=0-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (A6784, Sigma-Aldrich) y, a continuación, se prepararon las muestras a la dilución adecuada por duplicado. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación y, posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh (ThermoFisher Scientific). El contenido proteico será proporcional a la absorbancia detectada.

3.4.3. Protocolo de la técnica

3.4.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Los extractos citosólicos y nucleares se mezclaron con tampón de carga 6X (Dodecilsulfato de Sodio (SDS) 10%, β -mercaptoetanol 14M, Tris-HCl 2M pH 6.8, glicerol y azul de bromofenol 0.5%) para posteriormente desnaturalizar las proteínas a 100°C durante 5 minutos en el termobloque. Posteriormente, las muestras se prepararon a una dilución 1:10 con tampón 1X (Tampón 6X, H_2O estéril).

Tanto las muestras proteicas como el marcador de peso molecular se cargaron en un gel de acrilamida al 10%, previamente preparado. Concretamente, se utilizó el EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder (Fisher BioReagents®) de peso molecular comprendido entre 10-170 kDa. Además, se cargaron concentraciones iguales de proteínas en cada pocillo.

La electroforesis se realizó con el sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad®) utilizando un running buffer o tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1 % v/v). La electroforesis se realizó a voltaje constante durante 1h y 30 min a 120V.

3.4.3.2. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular, se hizo uso del Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad®) para realizar la transferencia de estas en el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm aplicando un amperaje constante de 350A durante 75 min en frío, utilizando un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol 20 % v/v).

Transcurrido este periodo de tiempo, las membranas se bloquearon en agitación suave (50 rpm) y a temperatura ambiente durante 1 hora con BSA o leche desnatada en polvo (Hacendado) al 5% en tampón de lavado TBS-T 1X (Tris Buffer Sulfate 1X, Tween 20 0.1%). Las proteínas de la solución de bloqueo se unirán a todos aquellos lugares de unión de la membrana que no estén ya ocupados por las transferidas de forma que el anticuerpo sólo podrá unirse a su antígeno específico, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

3.4.3.3. Incubación con anticuerpos

Tras el bloqueo, las membranas se incubaron *overnight* a 4°C y en agitación (50 rpm) con el anticuerpo primario correspondiente. Los anticuerpos primarios son específicos de la proteína de interés que se desea detectar (Tabla 3). En cuanto al control de carga se utilizó la proteína GAPDH para PMNs y HUVEC mientras que, en plaquetas, se utilizó β-actina (Tabla 3).

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados, junto con la dilución utilizada, su peso molecular y el revelador adecuado, para la detección de las proteínas P2X7, β-actina y GAPDH mediante la técnica de biología molecular Western blot.

Anticuerpo primario	Peso mol. (kDa)	Dilución empleada	Anticuerpo secundario	Dilución empleada	Revelador empleado
Anti-P2X7 antibody dirigido a N-terminal (ab93354, Abcam)	69	1:500 en leche 5%	Anti-Goat IgG HRP-conjugated antibody (HAF017, R&D Systems)	1:1000 en leche 5%	Immobilon® Forte Western HRP Substrate (WBLUF0500, Sigma-Aldrich)
Anti-P2X7 Receptor (extracellular) antibody dirigido a zona extracelular (P9122, Sigma-Aldrich)	72	1:1000 en BSA 5%	Anti-Rabbit IgG HRP-conjugated antibody (HAF008, R&D Systems)		SuperSignal™ West Femo Maximum Sensitivity Substrate (34096, ThermoFisher Scientific)
Anti-Actin (20-30) antibody produced in rabbit (A5060, Sigma-Aldrich)	43	1:1000 en leche 5%			Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (WBLUR0500, Sigma-Aldrich)
GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R) (MA5-15738, ThermoFisher Scientific)	34	1:5000 en leche 5%	Anti-Mouse IgG HRP-conjugated antibody (HAF007, R&D Systems)	1:1000 en leche 5%	

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X durante 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación rápida (150 rpm). A continuación, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación (50rpm) con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3). Finalmente, se realizaron otros tres lavados con TBS-T 1X para eliminar el exceso de anticuerpo.

3.4.3.4. Revelado: detección por quimioluminiscencia

En este paso, se procedió a la visualización de las bandas en la membrana mediante quimioluminiscencia utilizando el equipo Amersham ImageQuant 800 (Roche Diagnostics). Los anticuerpos secundarios están conjugados al enzima peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) que al adicionar los reveladores correspondientes para cada proteína (tabla 3) compuestos por peróxido de hidrógeno (agente oxidante) cataliza la conversión de sustratos cromogénicos en productos coloreados, y produce luz detectable por métodos espectrofotométricos.

Tras el revelado, se procedió con la técnica del *stripping* para eliminar los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa. Para ello, se incubaron las membranas con Restore™ Western blot Stripping Buffer (21063, ThermoFisher Scientific) durante 40 minutos a T^a ambiente y en agitación (150 rpm).

3.4.3.5. Análisis densitométrico de las bandas

Con respecto a la cuantificación de las bandas detectadas, se utilizó el software Fiji (ImageJ) (National Institutes of Health (NIH), Maryland, EEUU). El área de la banda de P2X7 se dividió por su correspondiente área de control de carga (GAPDH o β -actina) y dicho resultado se expresó en porcentaje con respecto a su vehículo.

3.5. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La variante de PCR conocida como transcripción inversa PCR (RT-PCR) va a permitir la detección del ARNm expresado por genes endógenos, en este caso, P2X7 y otros de interés.

3.5.1. Extracción y cuantificación de ARN procedente de la muestra experimental

El sedimento celular, previamente congelado a -80°C, se descongeló y se procedió a la extracción y purificación del ARN transcrito total mediante el empleo del kit RNA Spin Mini (GE25-0500-72, Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este proceso se realiza con la finalidad de obtener todo el ARNm presente que es codificado por los distintos genes que se quieren detectar. El pellet celular fue resuspendido en una solución de lisis junto con β -mercaptoetanol y homogeneizado con ayuda de una aguja de 25G. Posteriormente, se adicionó etanol al 70% y se transfirió a una columna para retener el ARN extraído. Después se incubó con ADNsa para eliminar el ADN genómico, se procedió a lavar las columnas 3 veces con las soluciones de lavado correspondientes, proporcionadas por el kit de extracción. Finalmente, el ARN fue eluido de la columna empleando agua libre de ARNsas.

Una vez extraído el ARN de las muestras se procedió a determinar su pureza y su concentración. Para ello, se empleó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Una vez cuantificado se procedió a la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc).

3.5.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa

El ADNc fue sintetizado por transcripción inversa o retrotranscripción (RT) empleando el kit de reactivos PrimeScript™ RT (RR037A, Takara Bio Inc.), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En esta reacción, el enzima transcriptasa reversa cataliza la síntesis del ADN a partir del ARN obtenido y que después será amplificado.

La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL usando 1 µg de ARN extraído resuspendido en H₂O libre de RNAsas (volumen final de 13 µL) y 4 µL de 5X PrimeScript Buffer, 1 µL de PrimeScript RT Enzyme Mix, 1 µL de Random nanomers y 1 µL de Cebador Oligo dT complementario a la terminación poliadenilada del ARNm de organismos eucariotas.

Dicha reacción se llevó a cabo en el termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) según las condiciones mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones utilizadas para la síntesis del ADNc empleando el termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems).

	Fase 1		Fase 2
Temperatura	37°C	85°C	4°C
Tiempo	15 min	5 seg	∞

3.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real

La RT-qPCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizó con SYBR® Premix Ex Taq™ (RR420W, Takara Bio Inc.) que contiene ADN polimerasa Takara Ex Taq HS, mezcla de dNTP, Mg²⁺, Tli RNasa H y TB Green I.

Se emplearon placas de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell (Roche Diagnostics) donde la reacción se llevó a cabo mezclando 1 µL de ADNc sintetizado, 5 µL de la pre-mezcla SYBR Ex Taq 2X, 2 µM del cebador sentido y antisentido del gen que se desea analizar, y agua libre de RNAsas en un volumen final de 10 µL. Se selló la placa con un plástico autoadhesivo (LightCycler® 480 Sealing Foil) y se centrifugó a 1200 rpm durante 1 minutos.

Los primers utilizados para la realización de las PCR (Tabla 5) fueron diseñados y adquiridos en Sigma-Aldrich.

La toma de datos se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real Light Cycler 96 (Roche Diagnostics), siguiendo el siguiente protocolo: 30 seg a 95°C; 5 seg a 95°C; 20 seg a 60°C (50 ciclos); 1 seg a 95°C; 15 seg a 65°C; 1 seg a 95°C y 30 seg a 40°C.

Los datos de RT-qPCR fueron analizados usando el método comparativo de C_T obteniendo la expresión génica relativa del gen de interés. Este método se basa en la ecuación:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

donde $\Delta\Delta C_T = C_T$ (gen de interés) – C_T (gen de control de carga). Se usó GAPDH como control de carga.

Tabla 5. Pares de cebadores específicos para humanos empleados en la técnica de biología molecular qRT-PCR.

		Secuencias			
		<i>Forward</i>	T ^a de hibrid. (°C)	<i>Reverse</i>	T ^a de hibrid. (°C)
Primers	P2X7R	5'- CACCGCAGACTACAAATTCC -3'	68,9	5'- GGGATACTCGGGACACAACC -3'	67,9
	P2X4R	5'- CCGAGATTCCAGATGCGAC -3'	65,9	5'- GGTAAGTAGTGGTGATGTTGGG -3'	62
	TFG-β1	5'- AGCAACAATTCCTGGCGATAC -3'	56,9	5'- CGGTAGTGAACCCGTTGATG -3'	48,3
	IL-β1	5'- TTC GAC ACA TGG GAT AAC GAG G -3'	67,9	5'- TTT TTG CTG TGA GTC CCG GAG -3'	68,4
	GAPDH	5'- GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC -3'	63,3	5'- TTCCCGTTCTAGCCTTGAC -3'	61,8

3.6. ESTADÍSTICA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Debido a una población muestral muy pequeña y la presencia de datos extremadamente atípicos (una de las columnas presenta valores repetidos al 100%), realizar una prueba de normalidad no sería confiable ni significativa. Dado este escenario, es adecuado optar por un enfoque no paramétrico en lugar de uno paramétrico, ya que los métodos no paramétricos son más flexibles y robustos frente a la falta de normalidad, ofreciendo resultados más confiables en este tipo de situaciones.

Ateniendo a los resultados, estos se expresaron como la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) para un número n de experimentos ≥ 3 , excepto algún experimento puntual donde $n=2$. Haciendo uso del programa GraphPad Prism® 8, se llevaron a cabo los análisis estadísticos:

- A la hora de comparar >2 grupos de tratamiento, se lleva a cabo un análisis de varianza ANOVA de una vía con medidas repetidas Kruskal-Wallis (no pareado, no paramétrico).
- Con el fin de comprar 2 grupos de tratamiento, se realiza análisis Mann-Whitney t test (no pareado, no paramétrico) o Kolmogorov-Smirnov t-test (no pareado, no paramétrico).

De manera general, se considera significativa la diferencia entre los diferentes grupos de tratamiento cuando p -value (p) $< 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE LA TÉCNICA WESTERN BLOT PARA PMNs

Se realizó una primera aproximación experimental para detectar el receptor P2X7 en PMNs aislados (20°C) de 8 donantes en condiciones basales sin ningún tipo de tratamiento. En esta aproximación experimental no se tuvo en cuenta el número de PMNs por volumen de solución de lisis (B1), el cual varió de 500.000-3.000.000 de PMNs/ μ l en función de cada donante. Como muestra la figura 8, en la primera membrana de Western blot de PMNs se cargó 25 μ g de proteína por pocillo procedentes de los 8 extractos proteicos, pero no se observó ninguna banda a ~ 72 KDa correspondiente receptor P2X7 según el anticuerpo ab93354 (Abcam). En extractos proteicos de HUVEC procedentes de 3 cordones umbilicales, utilizados como control positivo del receptor P2X7, se observa claramente una banda a ~ 72 KDa correspondiente a dicho receptor para el anticuerpo ab93354 (Abcam) (figura 8). No se detectó una buena banda del control de carga de

GAPDH en PMNs, aunque sí de la banda de β -actina tras *stripping* de la membrana (figura 8). Por ello, se repitió el Western blot de estas mismas muestras de extractos proteicos de PMNs cargando más proteína (85 μ g) en cada pocillo, pero tampoco se detectó ninguna banda a ~72 KDa correspondiente al receptor P2X7 (figura 8).

Para validar los anticuerpos que estábamos utilizando para cada proteína (receptor P2X7, GAPDH y β -actina), se realizó experimentos similares en las células HUVEC procedentes de 3 cordones umbilicales en condiciones basales, y en estas células se detectaron bandas a 72kDa, 43kDa y 34kDa correspondiente al receptor P2X7, β -actina y GAPDH respectivamente (figura 8).

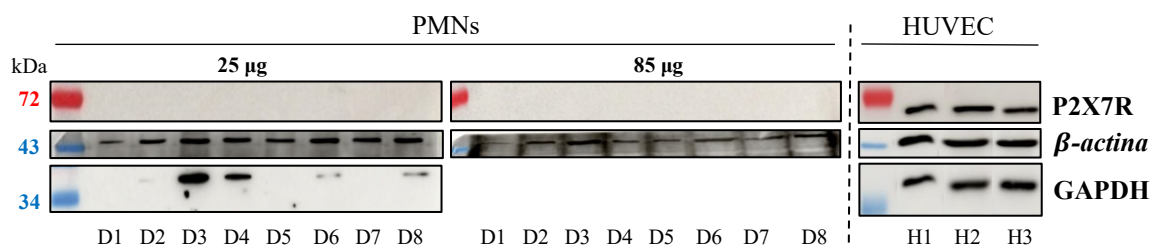


Figura 8. Western blot del receptor P2X7 en PMNs humanos y HUVEC. Los extractos proteicos de PMNs (carga 25 μ g o 85 μ g de proteína) proceden de 8 donantes (D1-D8), y los de HUVEC (carga 12 μ g de proteína) proceden de 3 cordones umbilicales (H1-H3). β -actina y GAPDH fueron utilizados como control de carga. Los anticuerpos utilizados fueron ab93354 (Abcam), A5060 (Sigma-Aldrich) y MA5-15738 (ThermoFisher Scientific) para la detección del receptor P2X7, β -actina y GAPDH, respectivamente.

El hecho de que a pesar de cargar hasta 85 μ g de proteína de PMNs, con el objetivo de incrementar la sensibilidad de detección del receptor, y no observamos mejoría en la banda de β -actina, junto con el problema de detectar la banda de GAPDH, implicó la realización de diferentes opciones experimentales manteniendo la carga del extracto proteico a 25 μ g/celda. El objetivo fue descartar que las proteínas no estuvieran siendo degradadas por la acción enzimática de los neutrófilos y, por tanto, impidiera detectar el receptor P2X7.

Para ello, en otro grupo de muestras de PMNs procedente de 4 donantes (D9 -D12) nuevos, se abordaron 3 condiciones experimentales diferenciales respecto al primer grupo de 8 donantes. Donde por cada muestra de cada donante se realizaron cambios que afectaron al método de aislamiento de los PMNs y de extracción de proteína de dichos PMNs:

- (i) Aislar PMNs a 4°C y a 20°C.
- (ii) Ajustar el número de PMNs por volumen de solución de lisis a ~50.000 PMNs/ μ L.
- (iii) Utilizar una nueva solución de lisis de diferente composición (B2) en lugar del B1.

Revisando esas condiciones en los primeros 8 donantes donde los PMNs se aislaron a 20°C y se utilizó solución de lisis B1 para la extracción de proteínas (figura 9), se aprecia que existe una ausencia de la banda de GAPDH en aquellas muestras donde el número de células por volumen de solución de lisis es $\geq 1 \times 10^6$ cél/ μ L (a excepción del donante 4), mientras que la banda más intensa de GAPDH corresponde a la condición de la extracción proteica de $\leq 5 \times 10^5$ PMNs/ μ L solución (donante 3). Por ello, el siguiente Western blot se realiza con extractos procedentes de 4 donantes donde el número de células siempre es inferior o igual a 5×10^5 PMNs/ μ L solución de lisis, pero donde se varía las condiciones de aislamiento de PMNs a 4°C y se utiliza otra solución de lisis diferente (B2) (figura 9).

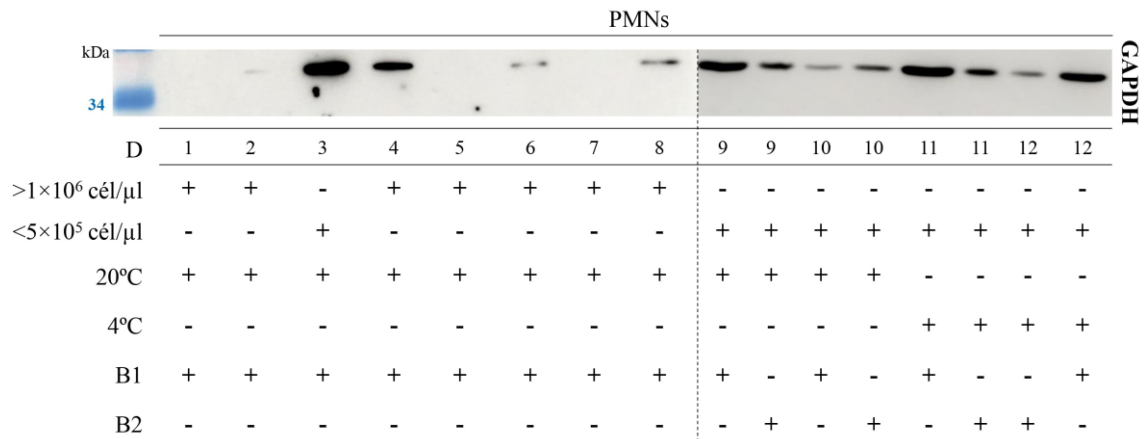
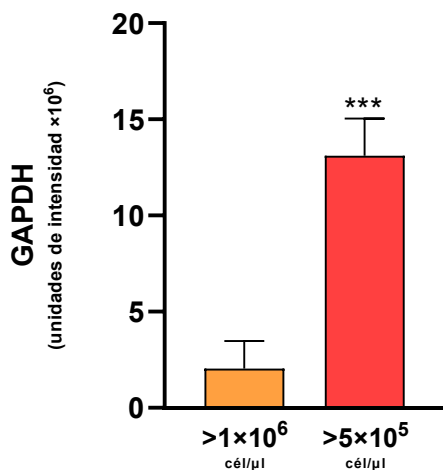


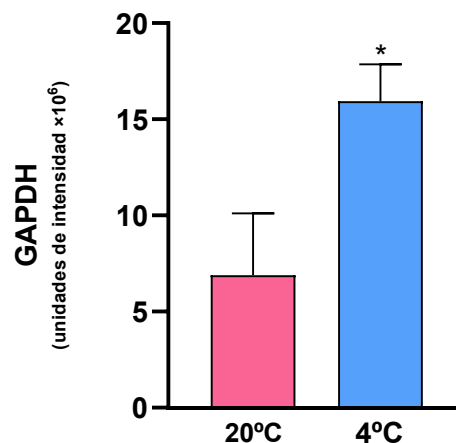
Figura 9. Western blot del GAPDH en PMNs humanos con diferentes condiciones experimentales. Los extractos proteicos de PMNs proceden de 12 donantes (D1-12) (carga 25 μg de proteína) con condiciones experimentales diferenciales respecto a; la temperatura de aislamiento de PMNs (37 °C y 4 °C), la composición de las soluciones de lisis (B1 y B2) para la extracción proteica, y la proporción de número de células por volumen de solución de lisis (>10⁶ cél/μL y <5×10⁵ cél/μL). La numeración repetida en los donantes D9-12 significa que las bandas corresponden al mismo donante. El anticuerpo para la detección del GAPDH utilizado es MA5-15738 (ThermoFisher Scientific).

La cuantificación de las bandas de GAPDH como referencia de optimización de la extracción proteica de los PMNs en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la figura 10. En la figura 10A, se compara la intensidad de las bandas de GAPDH de extracciones proteicas obtenidas con diferentes proporciones respecto al número de células por volumen de cualquier solución de lisis (B1 y B2), de forma que extracciones proteicas de menos de 5×10⁵ PMNs/μL proporciona una banda de GAPDH significativamente más intensa y uniforme (p ≤ 0.001) que la señal del GAPDH cuando la extracción proteica se realiza a partir de más de 1×10⁶ PMNs/μL. En la figura 10B, se ha mantenido constante la premisa de ≤ 5×10⁵ PMNs/μL solución de lisis para la obtención de los extractos proteicos, y se ha cuantificado la banda de GAPDH en función de la temperatura de aislamiento de los PMNs. De forma que observamos que el aislamiento de los PMNs a 4°C optimiza significativamente (p ≤ 0.05) la extracción del GAPDH. Por último, en la figura 10C se mantienen las premisas del número de células inferior a 5×10⁵ PMNs/μL y el método de aislamiento a 4°C, mientras que valoramos la importancia de la composición de la solución de lisis, siendo la solución B1 significativamente más eficaz para la extracción proteica del GAPDH que la B2.

A)



B)



C)

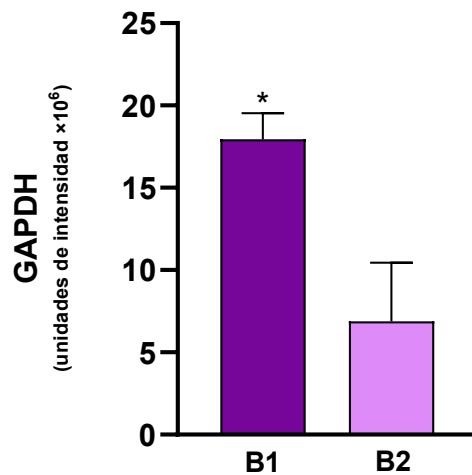


Figura 10. Cuantificación de la intensidad de la banda de GAPDH en extractos proteicos de PMNs humanos obtenidos en diferentes condiciones experimentales. (A) Diferente proporción de células por volumen de solución de lisis; la extracción proteica se ha realizado con un número inferior a 5×10^5 y superior a 5×10^5 PMNs/ μ L de solución de lisis de n° de donantes ($n \geq 7$). **(B) Diferente temperatura (4°C y 20°C) durante el aislamiento de PMNs;** los extractos proteicos se obtuvieron de ~ 50.000 PMNs/ μ L de solución de lisis ($n \geq 4$). **(C) Diferente composición de solución de lisis B1 vs B2;** tras aislar los PMNs a 4°C y a partir de extracción proteica de ~ 50.000 PMNs/ μ L de ($n \geq 2$). Los datos fueron analizados con el análisis estadístico t-test Mann-Whitney (no paramétrico) (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$).

A la vista de estos datos preliminares, los resultados presentados a continuación se han obtenido mediante el aislamiento de los PMNs a 4°C , y posterior extracción proteica a partir de ~ 50.000 PMNs/ μ L de la solución de lisis, cuya composición corresponde a la solución de lisis B1.

4.2. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS HUMANAS EN CONDICIONES BASALES

4.2.1. Expresión de la proteína P2X7 en PMNs empleando distintos anticuerpos

Se analizó si los neutrófilos expresaban el receptor P2X7 en condiciones basales, y se utilizó HUVEC humanas como control al ser un tipo celular que expresa dicho receptor. Además, en base al polimorfismo de dicho receptor, se utilizaron distintos anticuerpos anti-P2X7 dirigidos a diferentes epítomos de la proteína; ab93354 (Abcam) localiza la zona N-terminal del receptor mientras que, por otro lado, el anticuerpo P9122 (Sigma-Aldrich) localiza el epítomo extracelular del receptor.

La figura 11A muestra resultados distintos para los extractos de PMNs en función del anticuerpo utilizado. Al incubar las membranas con el anticuerpo ab93354 se observa una banda en todas las muestras ($n=9$, D11-D19) a $\sim 50\text{KDa}$ y en alguna de ellas una segunda banda a 72KDa . Estos datos coinciden con la referencia que proporciona la casa comercial (Anexo II). Si comparamos estos resultados con las HUVEC (figura 11C) frente anticuerpo ab93354, la banda del receptor P2X7 se observa muy nítidamente a $\sim 72\text{KDa}$ y no a 45KDa .

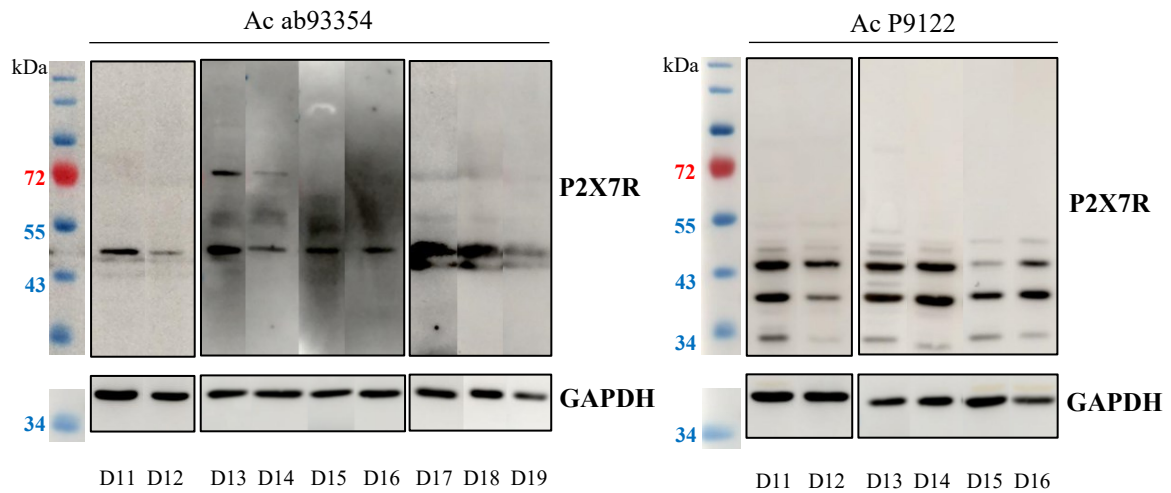
Por otro lado, las membranas incubadas con el anticuerpo P9122 (Figura 11A) de las muestras de PMNs, no mostraban ninguna banda a 72KDa y, además, se detectó un número de bandas que no concordaban con el receptor P2X7 según lo especificado por la casa comercial (Anexo III). Al comparar las membranas de PMNs con las de HUVEC (Figura 11C) incubadas con el anticuerpo

P9122, se observó la aparición de numerosas bandas que dificultaba la identificación de la señal correcta del P2X7 respecto las indicaciones comerciales.

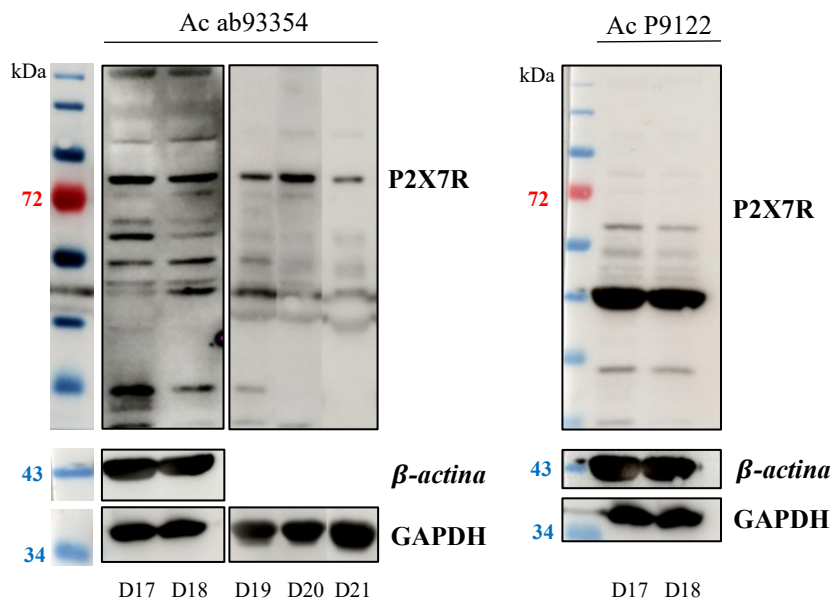
En plaquetas procedentes de 5 donantes, se observó una banda nítida a 72 KDa. Se demostró la presencia del receptor P2X7 al obtener una banda diferencial a la altura predicha por la casa comercial (Anexo II).

La diversidad de bandas utilizando el anticuerpo P9122 que no se ajustaba a la referencia de la casa comercial sugería poca especificidad de dicho anticuerpo, por lo cual el resto de los estudios del presente trabajo se llevaron a cabo con el anticuerpo ab93354.

A)



B)



C)

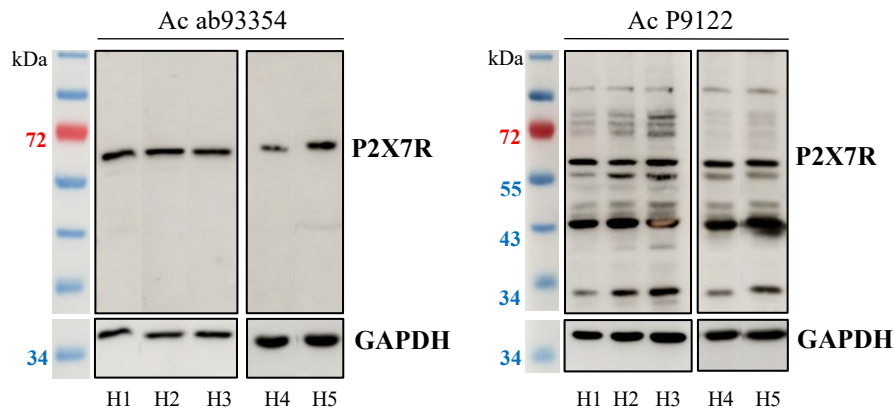
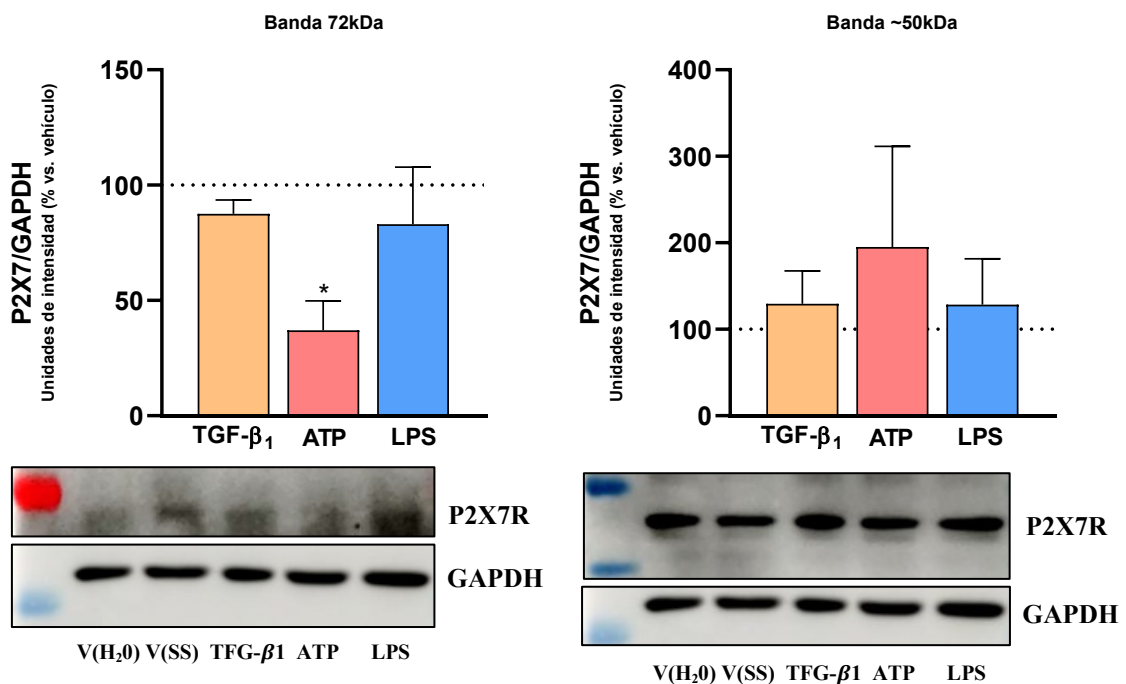


Figura 11. Membranas de Western blot de extractos de PMNs humanos (A), plaquetas (B) y HUVEC (C) frente a dos anticuerpos diferentes frente al receptor P2X7. ab93354 (Abcam) localiza la zona N-terminal del receptor y P9122 (Sigma-Aldrich) localiza el epítipo extracelular del receptor. Procedencia de la muestra; donante (D) y cordón umbilical (H).

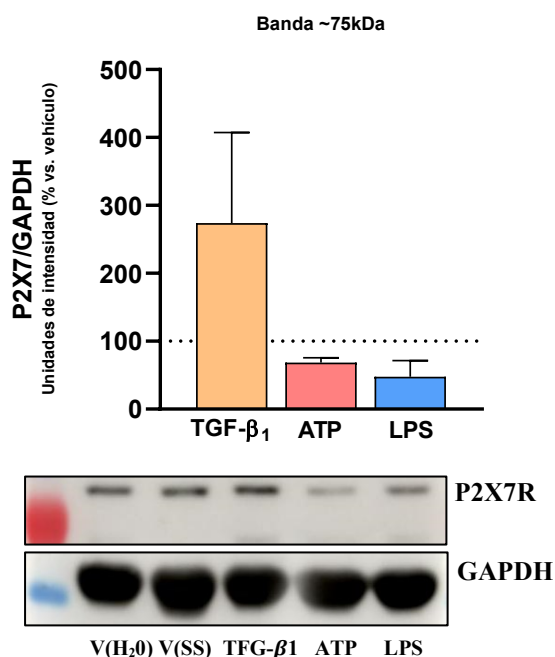
4.3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X7 EN NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS HUMANAS TRAS ESTÍMULOS INFLAMATORIOS Y FIBRÓTICOS

A continuación, se estudió la expresión del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas tras ser tratadas 4 h con estímulos inflamatorios (LPS o ATP) y fibróticos (TGF- β 1). Las HUVEC fueron también tratadas 4h con los mismos estímulos y utilizadas como control positivo de la expresión del receptor P2X7 (Figura 12D).

A)



B)



C)

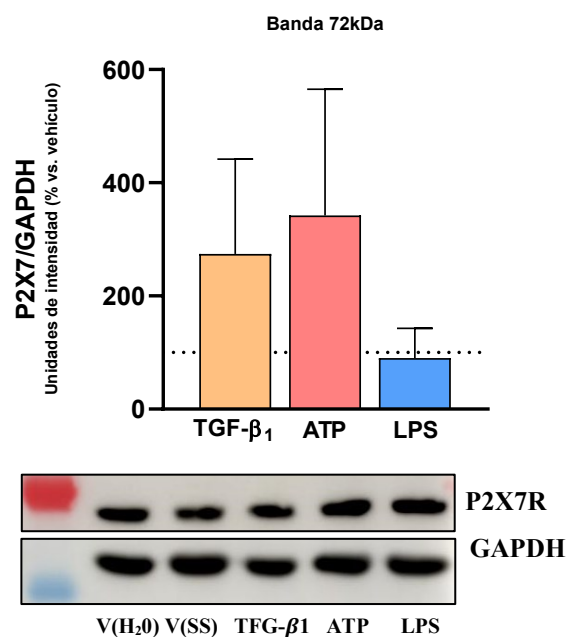


Figura 12. Análisis de la expresión proteica mediante la técnica de biología molecular Western blot a partir de extractos de (A) PMNs humanos, (B) plaquetas y (C) HUVEC tras 4 h de tratamiento con estímulos inflamatorios y pro-fibróticos. Las gráficas muestran la expresión de P2X7 expresado en porcentaje vs. control, utilizando como control de carga la GAPDH, tras el tratamiento con H₂O y solución salina (SS) como vehículos, TFG- β_1 (5ng/mL), ATP (4mM) y LPS (50ng/mL). También se muestran las membranas más representativas de los Western blot realizados para la proteína analizadas junto con el control de carga empleado. Los resultados de las gráficas se representan como la media \pm SEM (en PMNs, n=7; en plaquetas, n=3; en HUVEC, n=2). Los datos fueron analizados con el análisis estadístico Anova Kruskal-Wallis (no paramétrico) por las correcciones de Dunn (* $p < 0.05$).

En cuanto a los resultados mostrados en figura 12A, es destacable que en PMNs se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de la proteína P2X7 inducido por el estímulo pro-inflamatorio ATP a una muy alta concentración (4 mM), que únicamente afectaba a la banda de ~ 72 KDa, mientras que este cambio no se observó en la cuantificación de la banda de ~ 50 KDa. En las muestras de plaquetas (n=3) (figura 12B), donde solo se apreciaba la banda del receptor P2X7 a ~ 72 KDa, se muestra cierta tendencia a la baja, pero no significativa, en las bandas correspondientes a estímulos pro-inflamatorios (ATP o LPS), y dicha tendencia es opuesta en el caso del estímulo pro-fibrótico (TGF- β_1). Los tratamientos descritos mostraron mucha variabilidad en las dos muestras de HUVEC tratadas como se observa en la figura 12C.

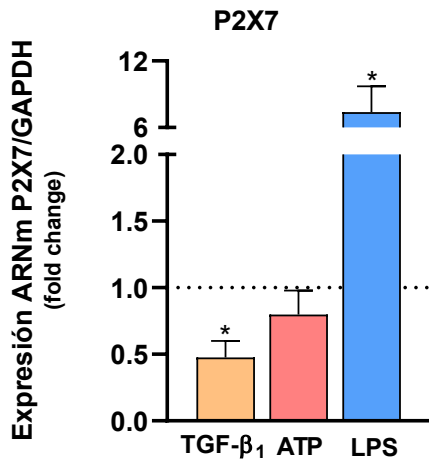
4.4. EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X7, P2X4 Y DE OTROS MEDIDADORES INFLAMATORIOS

En este caso, se estudió la expresión de los genes P2X7, P2X4, IL-1 β y TFG- β_1 en neutrófilos tras ser tratados 4 h con estímulos inflamatorios (LPS o ATP) y fibróticos (TGF- β_1).

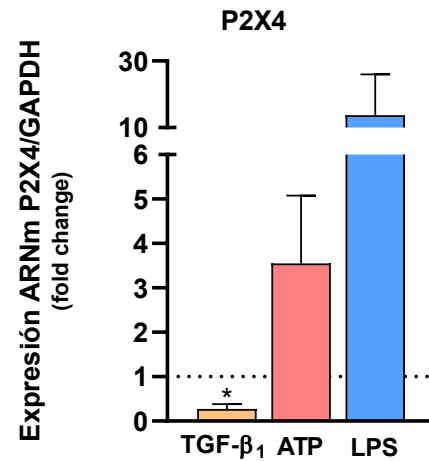
Respecto al gen del receptor P2X7 (figura 13A), se observa una regulación al alza ($p < 0.05$) inducida por el tratamiento de los PMNs con LPS (n=4), estímulo pro-inflamatorio, mientras que su expresión disminuye ante un estímulo diferente pro-fibrótico como es el TFG- β_1 . Es curioso que un receptor purinérgico de la misma familia y con mucha semejanza estructural, como el P2X4, tiene un comportamiento similar ante los estímulos citados, sólo que en el P2X4 no se

obtiene la significatividad con el tratamiento con LPS (n=3) (figura 13B). La expresión génica de la IL-1 β es incrementada significativamente (p<0.05) por el LPS, y aunque hay una tendencia a alza no es significativamente afectada por el agonista de receptores purinérgicos ATP (figura 13C). La expresión génica de TFG- β 1 no se ve significativamente modificada, se podría decir que tanto ATP como LPS tiene una tendencia a la baja, aunque no de forma significativa (Figura 13D).

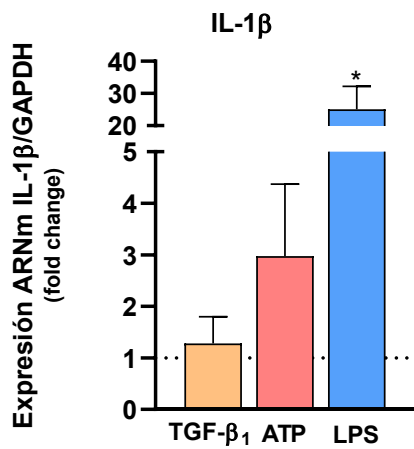
A)



B)



C)



D)

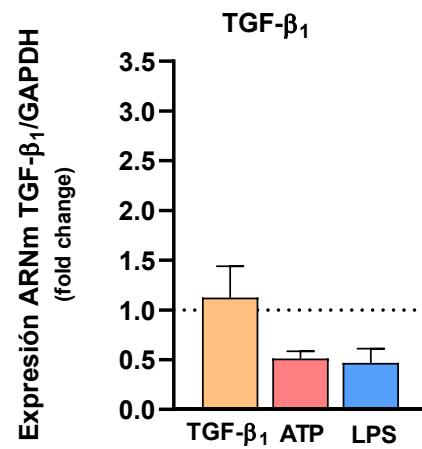


Figura 13. Efectos de estímulos proinflamatorios y profibróticos en la expresión de los genes (A) P2X7, (B) P2X4, (C) IL- β 1 y (D) TFG- β 1 en PMNs. La expresión fue analizada por RT-qPCR después de 4 h de tratamiento de los PMNs con TFG- β 1 (5ng/mL), ATP (4mM) y LPS (50ng/mL). Los resultados se representan respecto al vehículo (1 fold) de la media \pm SEM de n \geq 3. El análisis estadístico t-test Kolmogorov-Smirnov (no paramétrico) fue empleado para analizar los resultados (* p<0.05 vs vehículo).

5. DISCUSIÓN

El receptor purinérgico fue descubierto en 1976 por Burnstock, inicialmente asociado con la neurotransmisión purinérgica en los nervios (Burnstock, 1972). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que estos receptores no solo se encuentran en el cerebro, sino también en otros tejidos como el corazón, el pulmón, el hígado, la tiroides, el riñón y los tumores (Chen *et al.*, 2018). En la actualidad, el campo de la señalización purinérgica está bien establecido, y se comprenden ampliamente los roles fisiológicos que desempeña este sistema. Ahora, el enfoque se ha desplazado hacia la fisiopatología y el potencial terapéutico de la señalización purinérgica (Burnstock y Knight, 2018).

El receptor P2X7R se expresa en cardiomiocitos, células endoteliales vasculares y eritrocitos, así como en prácticamente todas las células inmunitarias, destacando especialmente los monocitos, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T (Burnstock y Knight, 2018; Chen *et al.*, 2018; Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). De hecho, se ha descrito su contribución en enfermedades derivada de la activación del sistema inmune (lupus, asma, Crohn, psoriasis, etc...) (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). En relación con ello, a nivel cardiovascular P2X7R está implicado en la inflamación y daño celular, asociándose a la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares, la aterosclerosis, la hipertensión, la trombosis y la retinopatía diabética (Stokes *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018). No obstante, también se ha demostrado que la activación de P2X7R protege al corazón contra la lesión miocárdica por isquemia-reperfusión, lo que presenta un fenómeno interesante, ya que, aunque induce una respuesta inflamatoria en el corazón, también protege contra dicha lesión (Chen *et al.*, 2018). Adicionalmente al relevante grupo de patologías mencionadas, muchos de los estudios actuales van dirigidos a evaluar el papel del receptor P2X7 en la señalización tumoral y metastásica. Por todas estas razones, investigar el receptor P2X7 es prometedor pues puede ser un objetivo terapéutico emergente para algunas enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Chen *et al.*, 2018). Esto resulta interesante pues en concreto, durante varias décadas, las enfermedades cardiovasculares (ECV) han sido la principal causa de muerte a nivel mundial que junto con el cáncer se ha mantenido consistentemente entre las diez principales causas (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020).

A nivel molecular, el ATP liberado de las células dañadas o infectadas provoca inflamación mediante la activación de P2X7R y la posterior liberación de citocinas inflamatorias, como la interleucina IL-1 β (Hechler y Gachet, 2015; Burnstock y Knight, 2018). Muchos de estos procesos podrían ser el resultado de la activación del complejo inflamasoma/P2X7R y patrones moleculares posteriores (citoquinas y caspasas) en un ambiente extracelular alto en ATP. Los leucocitos, como los PMNs, y las plaquetas son claves en la trombo-inflamación (Rosales, 2018; Rayes *et al.*, 2020). En concreto, se ha descrito que la activación de los receptores P2X7 por el ATP desencadena la activación de neutrófilos humanos y murinos que, a través del inflamasoma NLRP3, producen la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-18 (Karmakar *et al.*, 2016). En los sitios de lesión vascular, los nucleótidos de adenina, liberados masivamente por las plaquetas activadas, contribuyen tanto a la hemostasia como a la formación de trombos al amplificar en gran medida la mayoría de las respuestas plaquetarias (Hechler y Gachet, 2015). Además, los neutrófilos y las plaquetas también participan en la modulación de la respuesta inmunitaria. Los neutrófilos pueden regular la actividad de otras células inmunitarias y presentar antígenos a linfocitos. Las plaquetas, por su parte, pueden interactuar con células inmunitarias y liberar moléculas que afectan la respuesta inmunitaria (Rosales, 2018; Rayes *et al.*, 2020). Los datos sugieren que la interacción entre las plaquetas circulantes y los neutrófilos influye en las funciones inmunitarias innatas, contribuyendo posiblemente a regular la inflamación vascular (Maugeri *et al.*, 2009).

A pesar de toda la relevancia fisiopatológica propuesta sobre el receptor P2x7, la mayoría de los experimentos funcionales se han realizado en animal de experimentación o células transfectadas, aun así, existen claras evidencias de la localización en diversos tejidos humanos como las placas de ateroma, donde los neutrófilos y las plaquetas son elementos claves en su interacción con un endotelio dañado y la tromboinflamación. No obstante, escasos estudios han mostrado la

expresión del receptor en plaquetas y neutrófilos humanos, aunque sí en el endotelio. De hecho, en la literatura científica solo se encontraron dos artículos (Karmakar *et al.*, 2016; He *et al.* 2022) que aportan las membranas de Western blot con resultados positivos para el receptor, pero discutibles. Por ello, el principal objetivo es dar respuesta a la detección del receptor P2X7, en su forma nativa o condición basal, en neutrófilos y plaquetas humanas. Lo primero que observamos es la complejidad y la dificultad de detectar el receptor por técnicas de western blot en PMNs humanos, lo cual dirige nuestras investigaciones inicialmente a optimizar la técnica de extracción proteica en los PMNs.

Se le da importancia al uso de la inmunotransferencia para la detección de P2X7 debido a que esta técnica puede determinar potencialmente varias características importantes de las moléculas bajo examen, como su presencia y cantidades, sus pesos moleculares relativos, sus tasas de síntesis o degradación y la presencia de ciertas modificaciones postraduccionales (Gilbert *et al.*, 2002).

En la primera aproximación experimental para detectar el receptor en PMNs los datos demostraron que cargar más proteína no aumenta necesariamente la detección de dicho receptor. Por ello, se dio la necesidad de optimizar la técnica. La primera condición a ajustar fue la cantidad de proteína en μg a cargar en cada pocillo. En el artículo Lallier *et al.* (2019), ya confirmaron que la β -actina está saturada por encima de 15 μg de carga de proteína. En el presente estudio, esto se puede corroborar en los resultados, lo que permitió concluir que una carga de proteína entre 10-30 $\mu\text{g}/\text{carril}$ es óptima para cuantificar la proteína. Se debe destacar que este baremo se debe a las diferencias entre los distintos tipos celulares y sus métodos de aislamiento.

La temperatura de aislamiento de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) es importante por varias razones fundamentales relacionadas con la viabilidad y la funcionalidad de estas células inmunitarias especializadas. Tan pronto como ocurre la lisis, comienza la proteólisis, desfosforilación y desnaturación junto a esto se suma también que los PMNs tienen una vida corta y son propensos a la apoptosis. Estos eventos pueden ralentizarse considerablemente si las muestras se mantienen en hielo o a 4°C en todo momento y se agregan inhibidores adecuados frescos a la solución de lisis. Además, controlar la temperatura de aislamiento ayuda a evitar la activación no deseada de estas células y, por lo tanto, garantiza la integridad de las muestras y resultados. Al trabajar con el método en frío (4°C) se tuvo en cuenta en el procedimiento experimental adicionar una tableta cOplete Mini® a la solución de lavado PBS con el objetivo de minimizar el efecto de las proteasas al mínimo posible.

Nuestros datos apuntan a la importancia en optimizar la técnica de extracción proteica en PMNs humanos, comenzando por evitar la degradación de las proteínas manteniendo los neutrófilos a 4°C durante su aislamiento y utilizar una concentración adecuada de solución de lisis con inhibidores de proteasas suficientes para neutralizar la actividad enzimática del neutrófilo, es decir una adecuada proporción de células/ μl de solución. En el caso concreto de los PMNs, la relación número de células/volumen de buffer de lisis es un factor importante para una lisis celular efectiva y precisa. Los PMNs son células relativamente pequeñas y, a menudo, están presentes en cantidades limitadas en sangre periférica por lo que, una lisis ineficiente podría dar lugar a una pérdida significativa de extracto proteico, lo que podría afectar la representatividad de los resultados del análisis. Además, una buena relación número de PMNs/volumen de buffer de lisis ayuda a diluir las enzimas proteolíticas y otros factores inhibidores que podrían degradar estas proteínas críticas de interés. Por último, los PMNs pueden activarse fácilmente en respuesta a ciertos estímulos, lo que puede llevar a cambios en su comportamiento y liberación de contenido celular, incluyendo enzimas y radicales libres (ROS) antes de la lisis por lo que la optimización de esta condición permitiría una lisis controlada de las células.

Los análisis de proteomas de los neutrófilos son desafiantes debido a la presencia de una gran cantidad de proteasas endógenas como parte de su arsenal microbiciida (Muschter *et al.*, 2015). Esto sugiere el empleo de inhibidores de proteasa para obtener resultados precisos. El siguiente parámetro a ajustar es el tipo de solución de lisis que tiene importancia porque determinará la localización subcelular de la proteína extraída y, además, esto influirá en la detección de la

proteína por el anticuerpo específico. En cuanto a B1, según se describe en la composición del reactivo PhosphoSafe™ Extraction Reagent, se preserva el estado nativo de fosforilación a la vez que extrae proteínas citosólicas de células de mamíferos e incluye inhibidores de 5 fosfatasa que, además, se suplementará con tableta cOMplete Mini® de forma que se pueda inhibir un gran espectro de serina, cisteína y metaloproteasas, así como calpaínas. Por otro lado, B2 se trata de una solución de lisis que permite llevar a cabo una extracción de la célula completa. En este caso, al contener Tris-HCl, la proteína lisada provendría principalmente de la fracción citosólica o citoplasmática de las células. Y, además, al adicionar Triton X-100 en el buffer de lisis permite la ruptura de las membranas celulares y la liberación de proteínas que se encuentran en el citoplasma y en las organelas membranosas, como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Esto es especialmente útil cuando se desean extraer proteínas de localizaciones subcelulares específicas que están asociadas a membranas. La solución de lisis que ha demostrado proporcionar resultados óptimos es B1, específica para la extracción de células citosólicas. Este hallazgo es interesante dado que, a pesar de la evidencia que sugiere la localización del receptor en la membrana plasmática, el artículo de Gu *et al.* (2000) menciona que el receptor también se encuentra en la forma citosólica y que se transloca a la región transmembrana cuando se activa.

La elección y optimización de los anticuerpos se basó en varias consideraciones. Dentro del grupo de investigación, el anticuerpo ab93354 (Abcam) demostró resultados prometedores en células HUVEC al localizar específicamente el receptor P2X7 en su peso molecular correspondiente. Por lo tanto, su uso garantizaba resultados reproducibles. Además, el anticuerpo P9122 (Sigma-Aldrich) se seleccionó debido a la escasez de artículos disponibles con resultados prometedores en la detección del P2X7, en particular, los trabajos de Karmakar *et al.* (2016) y He *et al.* (2022). Ambos estudios utilizaron el anticuerpo APR-008 (Alomone) (Anexo IV), idéntico al ofrecido por Sigma-Aldrich (P9122). Es relevante mencionar que el anticuerpo ab93354 (Abcam) se dirige a la región N-terminal del receptor, lo que corresponde a la zona citosólica, mientras que el P9122 (Sigma-Aldrich) es específico de la porción extracelular del receptor. Existen artículos que evidencian la detección por citometría de flujo (Wong *et al.*, 2022; Blanch-Ruiz *et al.*, 2023) donde no se necesitaría la lisis ni extracción proteica del PMNs. Se elige un anticuerpo que va a la zona extracelular por si no se detectaba por Western blot y se procedía a intentarlo por citometría de flujo. Finalmente, se descartó el uso del anticuerpo P9122 debido a sus resultados inespecíficos al visualizar las bandas. Esto sugiere que el anticuerpo no es confiable para la detección del receptor. Además, los resultados obtenidos en otros artículos que mencionan este anticuerpo fueron poco concluyentes, lo que cuestiona aún más su utilidad en esta investigación. En el trabajo de He *et al.* (2022), se detectó una banda a 55 kDa que no coincidía con la información proporcionada por la casa comercial. Este hallazgo plantea dudas sobre la especificidad del anticuerpo utilizado y pone en entredicho la validez de sus resultados. Por otro lado, el estudio de Karmakar *et al.* (2016) detectó una banda a 72 kDa que coincidía con la información de la casa comercial. Sin embargo, se observa una banda difuminada que dificulta la interpretación precisa de los resultados y puede generar dudas sobre la fiabilidad del ensayo. Las membranas completas se muestran en resultados complementarios con dudosa apariencia y además, es importante resaltar que el trabajo que reporta solo dos donantes en sus experimentos con PMNs humanos en condiciones basales por lo que no proporciona un tamaño de muestra suficientemente representativo. Una muestra pequeña puede llevar a conclusiones prematuras o a generalizaciones inadecuadas, lo que pone en duda la robustez de sus resultados. Con respecto al artículo Wong *et al.* (2022) que analiza plaquetas humanas, no fue posible acceder al anticuerpo utilizado debido a que estaba sintetizado por los investigadores y no estaba comercializado. Esto representa una limitación significativa, ya que la falta de acceso al anticuerpo restringe la posibilidad de replicar los experimentos y validar los resultados.

Ahora bien, en nuestro estudio, presentamos uno de los primeros trabajos que localiza el receptor mediante la técnica Western blot utilizando un anticuerpo validado por la casa comercial. La utilización de un anticuerpo comercialmente validado aumenta la confianza en los resultados, ya que se ha demostrado su especificidad y sensibilidad en investigaciones anteriores. Además, no solo se ha investigado en PMNs y plaquetas humanas en condiciones basales, sino que también se han realizado análisis en otros tejidos humanos, como HUVEC. Esto nos permite obtener una

visión más completa del receptor y su expresión en diferentes contextos celulares. A través de una cuidadosa evaluación de los estudios previos que intentaron detectar el receptor en PMNs y plaquetas humanas, hemos destacado las limitaciones y debilidades de esos enfoques. Nuestro trabajo representa un avance significativo al obtener resultados validados por la casa comercial y al incluir un análisis paralelo en diferentes tejidos humanos. Estas decisiones metodológicas nos permitieron obtener resultados más sólidos y confiables, lo que respalda nuestra conclusión de que hemos localizado el receptor de manera efectiva mediante Western blot. En resumen, para la detección del receptor P2X7 humanos es requisito indispensable evitar al máximo la acción de las proteasas del neutrófilo y la selección de un anticuerpo selectivo y validado.

Un aspecto relevante durante el estudio fue el uso de células HUVEC como control positivo en todos los resultados, ya que se ha corroborado ampliamente que expresan P2X7 a ~72 kDa de manera sistemática. Este control positivo fue fundamental para tomar decisiones y discutir el anticuerpo más adecuado para la detección y confirmación del receptor bajo estas condiciones.

Una vez optimizado el protocolo de la técnica, se prosigue con el cumplimiento de los objetivos propuestos. Se ha considerado que la detección del receptor P2X7 mediante la técnica Western blot ha sido objeto de controversia y la literatura que reporta resultados positivos es escasa. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es detectar el receptor P2X7 utilizando dicha técnica en tipos celulares específicos, como los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y las plaquetas, debido a su relevancia en la inflamación y las enfermedades cardiovasculares desde el punto de vista fisiopatológico.

Los experimentos de Western blot para la detección del receptor se diseñaron para abordar dos situaciones: extractos proteicos en condiciones basales y tratados con estímulos inflamatorios y fibróticos. De esta manera, en el primer caso se pudo determinar si el P2X7 se encuentra presente de manera nativa en los tipos celulares sin ningún estímulo externo, mientras que, al tratar las células, se pudo cumplir un objetivo específico como era analizar el efecto de dichos estímulos en la expresión del receptor. En ambos casos, se confirmó la presencia del receptor P2X7 tanto en PMNs como en plaquetas. Sin embargo, es importante destacar que, en condiciones basales, se observó una variación en el tamaño molecular de la banda detectada en cada tipo celular: 69 kDa en HUVEC, 72 kDa en PMNs y aproximadamente 75 kDa en plaquetas. Estos hallazgos sugieren que el receptor P2X7 puede presentar diferentes isoformas o variantes de la proteína puedan resultar de modificaciones post-traduccionales, como glicosilación, fosforilación, o de procesamiento alternativo del ARNm. El ARN mensajero que codifica el receptor P2X7 puede ser sometido a splicing alternativo lo que da lugar a distintas variantes que pueden diferir en su secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, en su tamaño molecular. En el caso concreto de la glicosilación, las proteínas pueden ser glicosiladas en diferentes sitios, dependiendo del tipo celular y el estado fisiológico, añadiendo grupos carbohidratos que afectan al peso molecular aparente. Sluyter (2017) expone que Tanto las subunidades P2X7 humanas como las de roedores se glicosilan, lo que resulta en productos proteicos de un tamaño típico de 75 a 78 kDa en comparación con el tamaño no glicosilado previsto de 68 kDa. Todas estas estas modificaciones pueden afectar la carga eléctrica y la conformación de la proteína, lo que conduce a diferentes movilidades en un gel de Western blot. En algunos casos, la proteína objetivo puede estar sometida a proteólisis o degradación proteolítica en ciertos tipos celulares, lo que resulta en fragmentos más pequeños que pueden ser detectados por el anticuerpo utilizado en el Western blot.

A la hora de analizar el efecto de estímulos, se debe aportar un contexto del uso de los distintos estímulos. El TGF- β 1 o factor de crecimiento transformador beta 1 es una citocina multifuncional que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformador beta (TGF- β). En el contexto de la inflamación y la respuesta inmunitaria, el TGF- β 1 es conocido por tener efectos antiinflamatorios y de regulación inmunitaria (Xie *et al.*, 2022) dependiendo del tipo celular, el microambiente y la duración de la exposición. Además, el TGF- β está ampliamente implicado en la patogénesis de la fibrosis. En las lesiones fibrosas, la generación espacialmente restringida de TGF- β bioactivo a partir de reservas latentes requiere la cooperación de proteasas, integrinas y moléculas especializadas de la matriz extracelular (Frangogiannis, 2020).

El trifosfato de adenosina (ATP) ha sido reconocido durante mucho tiempo como la molécula de moneda de energía intracelular de la célula. A nivel extracelular, el ATP es una señal paracrina de daño o inflamación capaz de activar numerosos receptores P2X, incluido el P2X7, con diferente selectividad y sensibilidad. En particular, el ATP es el agonista o ligando endógeno más común del receptor P2X7. Tiene efectos distintos sobre su activación dependiendo de su concentración en el sitio activo. Se ha observado que altas concentraciones de eATP (en el rango milimolar con $EC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$) son necesarias para activar el receptor P2X7. (Savio *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018).

El lipopolisacárido (LPS), que es un componente principal de la membrana externa de bacterias gramnegativas. El LPS es un potente estimulador del sistema inmunitario y desencadena una fuerte respuesta inflamatoria en los mamíferos para la defensa del organismo contra infecciones bacterianas. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva o desregulada al LPS puede estar involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Atendiendo a los resultados, se observa de forma significativa que una concentración elevada de ATP (4mM) necesaria para activar al receptor, provoca una disminución de la expresión de este. Se discute que, si el receptor está activado de forma excesiva, se podría estar produciendo una downregulation o regulación a la baja de este. Este proceso es un mecanismo celular de autorregulación en respuesta a una sobreestimulación crónica del receptor por su ligando. Implica una disminución del número de receptores en la superficie celular debido a su internalización y degradación en el interior celular. Este proceso previene la sobreexcitación y protege la célula de respuestas celulares descontroladas ante altas concentraciones del ligando. Además, reduce la sensibilidad celular al ligando, permitiendo que la célula vuelva a ser más sensible a estímulos futuros. También, se podría razonar que una concentración tan elevada puede estar induciendo a apoptosis al receptor P2X7. Otra razón es que la expresión de genes, incluido el receptor P2X7, puede estar regulada a nivel transcripcional mediante factores de transcripción y mecanismos epigenéticos. Estos mecanismos de regulación a nivel transcripcional pueden ser influenciados por señales extracelulares, como la concentración de ATP, y por factores internos de la célula que responden a cambios en el entorno. Así mismo, la estabilidad del ARNm del receptor P2X7 puede ser influenciada por la concentración de ATP y otras señales celulares.

Es comprensible que los resultados obtenidos en plaquetas y HUVEC no hayan sido significativos, lo que dificulta la discusión y la interpretación de los datos. Por una parte, el tiempo de estimulación de 4 horas puede no ser suficiente para regular la expresión del receptor en HUVEC o en el resto de los tejidos. La regulación de la expresión génica a menudo puede requerir un período más prolongado para observar cambios significativos en la proteína. Es posible que un tiempo más largo de estimulación sea necesario para obtener resultados más concluyentes, aunque existe una limitación en cuanto a viabilidad celular con lo que a PMNs y plaquetas respecta. En aislamiento cambia la homeostasis celular y las células pueden morir. Además, es importante mencionar que las plaquetas carecen de núcleo y, por lo tanto, no tienen la misma capacidad que los neutrófilos para modular la expresión del receptor. Esto puede influir en la forma en que responden al estímulo y en la detección del receptor en Western blot. Otro de los factores principales que podría haber contribuido a la falta de significancia es el tamaño de muestra insuficiente ($n < 3$). Además, existen varias razones adicionales como la variabilidad biológica entre donantes, ya que las respuestas celulares pueden diferir entre individuos y los errores experimentales. Junto a esto, es importante considerar cuidadosamente los procedimientos experimentales para minimizar posibles sesgos. La heterogeneidad de la muestra también puede ser un factor relevante. Cada tipo de célula y tejido puede tener diferentes propiedades y regulación del receptor, lo que puede afectar la respuesta a la estimulación y, en última instancia, los resultados obtenidos.

Para alcanzar el objetivo de detectar el gen P2X7 en neutrófilos mediante RT-PCR, se implementaron protocolos utilizando células de PMNs previamente estimuladas. Sin embargo, en este tipo celular, la detección de la señal de P2X7 mediante esta técnica ha sido poco documentada

en la literatura científica. De hecho, Martel Gallegos *et al.* (2010) afirma de manera concluyente que los neutrófilos humanos no expresan receptores purinérgicos P2X7.

Además de analizar la expresión del gen P2X7, se realizó una evaluación complementaria de la expresión de genes relacionados con la inflamación, tales como P2X4, IL- β 1 y TFG- β 1. Se confirma la presencia del gen del P2X7 en neutrófilos y, además, se lleva a cabo la evaluación de otros genes relacionados: el P2X4, debido a su similitud estructural con el P2X7 y su papel en la inflamación, y también aquellos involucrados en procesos inflamatorios (ATP y LPS) y/o fibróticos (TFG- β 1). Esta estrategia permite investigar posibles funciones compartidas y analizar la posible participación de los neutrófilos en respuestas inflamatorias y fibróticas, lo que proporciona una visión más completa de su potencial papel en estos procesos biológicos.

Adicionalmente se utilizan condiciones estimuladas para estudiar la modulación génica por TFG- β 1, ATP y LPS. En el análisis de la expresión del receptor P2X7, el estímulo con TGF- β 1 a una concentración de 5 ng/ml disminuye la expresión del receptor P2X7. Esto se podría explicar porque TGF- β 1 podría regular negativamente la expresión de varios genes a través de mecanismos de señalización específicos. Podría activar vías de señalización que conducen a la represión de la transcripción de P2X7 de forma que la cantidad de ARNm del receptor P2X7 disminuye, lo que se traduce en una disminución de su expresión en la superficie celular. Al interactuar con receptores específicos en la membrana celular, TGF- β 1 activa cascadas de señalización que pueden afectar la unión de ciertos factores de transcripción a los promotores del gen P2X7 y provocar una disminución en su transcripción. Además, también se podría argumentar que puede promover la degradación de la proteína P2X7 a través de mecanismos de ubiquitinación y proteasoma. Por último, podría inducir la diferenciación de células inmunitarias hacia un fenotipo supresor o regulador que podría reducir la expresión del receptor P2X7 en neutrófilos. El estímulo LPS aumenta la expresión del gen tal y como se esperaba. Cuando las células del sistema inmunológico como los neutrófilos detectan la presencia de LPS, activan una cascada de señalización que lleva a la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β). Estas citocinas pueden actuar como señales de retroalimentación positiva para aumentar la expresión del receptor P2X7. Además, la estimulación con LPS puede aumentar la liberación de ATP desde las células inmunitarias, que actúa como una señal de peligro para el sistema inmunológico. El ATP liberado activa los receptores P2X7, y esta activación puede, a su vez, inducir una amplificación positiva de la expresión del gen P2X7.

Con respecto al gen P2X4, se obtienen unos resultados muy parecidos al P2X7. Ambos miembros de la familia de receptores purinérgicos son muy similares estructuralmente y aun que no sale significativo.

Los resultados mediante RT-PCR no corroboran que el ATP disminuya significativamente la expresión del receptor P2X7 como mediante Western blot. Aun así, la cantidad de proteína y ARNm de un gen específico no siempre se correlaciona directamente. Los niveles de expresión de una proteína pueden variar debido a la regulación postranscripcional, la estabilidad de la proteína y otros procesos que ocurren después de la transcripción del ARNm.

El estímulo por LPS es el único que ha aumentado significativamente la expresión de los genes implicados en la inflamación; no solo los dos receptores purinérgicos P2X7 y P2X4 sino también y esperable la IL-1 β al ser una citocina proinflamatoria clave. La falta de significatividad en el incremento del gen P2x4 inducido por LPS podría estar relacionado con un número bajo de muestras (n=3).

En este estudio se observó que el gen TFG- β 1 no mostró una regulación significativa en respuesta a ningún estímulo. Esta falta de regulación podría estar relacionada con la limitada población muestral utilizada (n=3) y posibles errores experimentales. Es importante destacar que el gen TFG- β 1 está estrechamente vinculado con procesos fibróticos, pero a pesar de ello, los estímulos empleados en este estudio no lograron modular su expresión, ni siquiera la proteína TFG beta 1. Para obtener una mayor comprensión de la regulación del gen TFG- β 1 y su papel en procesos

inflamatorios y fibróticos, se recomienda proponer experimentos adicionales con un número de muestras más amplio y cuidadosamente diseñados.

Por último, se ha de mencionar que la prueba RT-PCR no fue testada en plaquetas debido a la falta de núcleo y la escasez de material genético, no es la técnica más adecuada para analizar directamente el ADN en plaquetas.

A modo de conclusión, se ha confirmado la expresión basal del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas mediante técnicas de Western blot. La controversia previa sobre su existencia puede atribuirse a posibles variables técnicas, como el aislamiento de los PMNs, la conservación del extracto proteico o la especificidad del anticuerpo empleado en estudios anteriores. Además, los resultados sugieren que, en neutrófilos humanos, concentraciones elevadas de ATP están asociadas con una disminución en la expresión proteica del receptor P2X7. Esto indica que la sobre-estimulación del receptor puede dar lugar a una *downregulation* como un mecanismo de autorregulación celular para evitar respuestas excesivas o descontroladas. Por otro lado, se observó que el LPS induce un aumento en la expresión génica del receptor P2X7 en neutrófilos. Este hallazgo sugiere que el LPS, un componente bacteriano que desencadena respuestas inflamatorias puede tener un efecto regulador en la expresión del receptor P2X7 en estas células.

En conjunto, estos resultados aportan información valiosa sobre la expresión y regulación del receptor P2X7 en neutrófilos y plaquetas humanas. Sin embargo, es importante reconocer que aún existen interrogantes y desafíos en la investigación de este receptor, y futuros estudios con una mayor variedad de enfoques experimentales podrían contribuir a una comprensión más completa de su función y relevancia en procesos inflamatorios y con ello, enfermedades cardiovasculares.

6. CONCLUSIONES

1. La metodología utilizada en el aislamiento de los neutrófilos humanos y de la obtención del extracto proteico de los mismos es importante en las técnicas de Western blot para evitar la degradación de las proteínas; de forma que, tanto el aislamiento de neutrófilos en frío (4 °C), como el uso de inhibidores de proteasas en la solución de lisis que debe estar a una proporción adecuada respecto al número de neutrófilos (<500000 cél/ μ l) optimiza la extracción proteica medida por la cuantificación de la banda de GAPDH.
2. Aumentar la carga del extracto proteico de 25 μ g a 85 μ g no mejora la sensibilidad para detectar el receptor P2X7 mediante Western blot en neutrófilos humanos.
3. El receptor P2X7 es detectado por Western blot en neutrófilos y plaquetas humanas en condiciones basales.
4. La elección del anticuerpo anti-P2X7 influye significativamente en los resultados del Western blot en neutrófilos humanos. El anticuerpo de ab93354 (Abcam) demostró especificidad sobre el receptor P2X7 en la detección de la banda correspondiente a aproximadamente 72 kDa.
5. Los neutrófilos muestran una banda adicional de aproximadamente 50 kDa para el receptor P2X7 en comparación con las plaquetas y las células del cordón umbilical humano (HUVEC)
6. Los estímulos proinflamatorios (ATP o LPS) y profibróticos (TGF- β 1) a las 4 horas no alteran la expresión del receptor P2X7 en plaquetas ni en HUVEC. De estos estímulos, sólo el ATP a concentraciones muy altas (4mM) disminuyó la expresión del receptor P2X7 en neutrófilos humanos.
7. En neutrófilos humanos y en condiciones basales, se ha detectado ARNm de los receptores P2X4, P2X7 y de moléculas como IL-1 y TGF- β 1.
8. En condiciones estimuladas en neutrófilos humanos, el LPS aumenta la expresión génica del receptor P2X7 e IL- β 1, mientras que el TGF- β 1 disminuye el ARNm de los receptores P2X4 y P2X7.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ANDREJEW, R., OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á., RIBEIRO, D. E., GLASER, T., ARNAUD-SAMPAIO, V. F., LAMEU, C., & ULRICH, H. (2020). The P2X7 receptor: Central hub of brain diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00124>
- BLANCH-RUÍZ, M. A., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., RÍOS-NAVARRO, C., ORTEGA-LUNA, R., COLLADO-DÍAZ, V., ORDEN, S., MARTÍNEZ-CUESTA, M. A., ESPLUGUES, J. V., & ÁLVAREZ, Á. (2023). Abacavir causes leukocyte/platelet crosstalk by activating neutrophil P2X7 receptors thus releasing soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *British Journal of Pharmacology*, 180(11), 1516–1532. <https://doi.org/10.1111/bph.16016>
- BROWNE, L. E., COMPAN, V., BRAGG, L., & NORTH, R. A. (2013). P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3557–3566. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-12.2013>
- BUELL, G. N., Talabot, F., Gos, A., Lorenz, J., Lai, E., Morris, M. A., & Antonarakis, S. E. (1998). Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors & Channels*, 5(6), 347–354. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9826911/>
- BURNSTOCK, G. (1971). Neural nomenclature. *Nature*, 229(5282), 282–283. <https://doi.org/10.1038/229282d0>
- BURNSTOCK, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), 509–581. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4404211/>
- BURNSTOCK, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)
- BURNSTOCK, G. (1996). Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny. *Drug Development Research*, 39(3–4), 204–242. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2299\(199611/12\)39:3/4<204::aid-ddr2>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2299(199611/12)39:3/4<204::aid-ddr2>3.0.co;2-v)
- BURNSTOCK, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(3), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>
- BURNSTOCK, G. (2017). Purinergic signalling: Therapeutic developments. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 661. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
- BURNSTOCK, G., & RALEVIC, V. (2014). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 102–192. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008029>
- CANKURTARAN-SAYAR, S., SAYAR, K., & UGUR, M. (2009). P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Molecular Pharmacology*, 76(6), 1323–1332. <https://doi.org/10.1124/mol.109.059923>
- CHEN, Y., SHUKLA, A., NAMIKI, S., INSEL, P. A., & JUNGER, W. G. (2004). A putative osmoreceptor system that controls neutrophil function through the release of ATP, its conversion to adenosine, and activation of A2 adenosine and P2 receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(1), 245–253. <https://doi.org/10.1189/jlb.0204066>
- CHEN, Z., HE, L., LI, L., & CHEN, L. (2018). The P2X7 purinergic receptor: An emerging therapeutic target in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 479, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.032>

- CIRUELA, F., & JACOBSON, K. A. (2023). Editorial: Purinergic pharmacology, volume II. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1200187. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1200187>
- CODDOU, C., YAN, Z., OBSIL, T., HUIDOBRO-TORO, J. P., & STOJILKOVIC, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>
- DE SALIS, S. K. F., LI, L., CHEN, Z., LAM, K. W., SKARRATT, K. K., BALLE, T., & FULLER, S. J. (2022). Alternatively spliced isoforms of the P2X7 receptor: Structure, function and disease associations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8174. <https://doi.org/10.3390/ijms23158174>
- DI VIRGILIO, F., DAL BEN, D., SARTI, A. C., GIULIANI, A. L., & FALZONI, S. (2017). The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- DÍAZ, V. C. (2018). Estudio de la implicación del receptor P2X7 en los efectos proinflamatorios de Abacavir. Departamento de Farmacología, Universidad de Valencia.
- DRURY, A. N., & SZENT-GYÖRGYI, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 68(3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>
- FRANCO, A. T., CORKEN, A., & WARE, J. (2015). Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood*, 126(5), 582–588. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-531582>
- FRANGOGIANNIS, N. (2020). Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(3), e20190103. <https://doi.org/10.1084/jem.20190103>
- FULLER, S. J., STOKES, L., SKARRATT, K. K., GU, B. J., & WILEY, J. S. (2009). Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signalling*, 5(2), 257–262. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9136-4>
- GILBERT, C., ROLLET-LABELLE, E., CAON, A. C., & NACCACHE, P. H. (2002). Immunoblotting and sequential lysis protocols for the analysis of tyrosine phosphorylation-dependent signaling. *Journal of Immunological Methods*, 271(1–2), 185–201. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00347-2](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00347-2)
- 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*, 279(4), C1189-97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.C1189>
- HE, Z., WANG, C., WANG, J., ZHENG, K., DING, N., YU, M., LI, W., TANG, Y., LI, Y., XIAO, J., LIANG, M., & WU, Y. (2022). Chlamydia psittaci inhibits apoptosis of human neutrophils by activating P2X7 receptor expression. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 312(8), 151571. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2022.151571>
- HECHLER, B., & GACHET, C. (2015). Purinergic receptors in thrombosis and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(11), 2307–2315. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>
- HUANG, Z., XIE, N., ILLES, P., DI VIRGILIO, F., ULRICH, H., SEMYANOV, A., VERKHRATSKY, A., SPERLAGH, B., YU, S.-G., HUANG, C., & TANG, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 162. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

- JIANG, L.-H., BALDWIN, J. M., ROGER, S., & BALDWIN, S. A. (2013). Insights into the molecular mechanisms underlying mammalian P2X7 receptor functions and contributions in diseases, revealed by structural modeling and single nucleotide polymorphisms. *Frontiers in Pharmacology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00055>
- 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*, 289(5), C1295–C1302. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00253.2005>
- KARMAKAR, M., KATSNELSON, M. A., DUBYAK, G. R., & PEARLMAN, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nature Communications*, 7(1), 10555. <https://doi.org/10.1038/ncomms10555>
- KOLACZKOWSKA, E., & KUBES, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- LALLIER, S. W., HILL, C. L., NICHOLS, D. P., & REYNOLDS, S. D. (2019). Protein abundance determination: An optimized western blot workflow. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 49(4), 507–512. <http://www.annclinlabsci.org/content/49/4/507.abstract>
- LARA, R., ADINOLFI, E., HARWOOD, C. A., PHILPOTT, M., BARDEN, J. A., DI VIRGILIO, F., & MCNULTY, S. (2020). P2X7 in cancer: From molecular mechanisms to therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 793. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793>
- LAZAROWSKI, E. R., & SCHWARZBAUM, P. J. (2009). Señales purinérgicas. *Medicina*, 69(2), 267–276. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802009000300010
- LINDEN, J., KOCH-NOLTE, F., & DAHL, G. (2019). Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response. *Annual Review of Immunology*, 37(1), 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052406>
- LÓPEZ VILLAR, E., NOMBELA CANO, C., & RØSSEL LARSEN, M. (2008). Metodologías fosfoproteómicas útiles en estudios clínicos. *Inmunologia (Barcelona, Spain: 1987)*, 27(1), 36–44. [https://doi.org/10.1016/s0213-9626\(08\)70047-7](https://doi.org/10.1016/s0213-9626(08)70047-7)
- MARQUES-DA-SILVA, C., CHAVES, M. M., CASTRO, N. G., COUTINHO-SILVA, R., & GUIMARAES, M. Z. P. (2011). Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action: Colchicine inhibits P2X pores. *British Journal of Pharmacology*, 163(5), 912–926. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01254.x>
- MARTEL-GALLEGOS, G., ROSALES-SAAVEDRA, M. T., REYES, J. P., CASAS-PRUNEDA, G., TORO-CASTILLO, C., PÉREZ-CORNEJO, P., & ARREOLA, J. (2010). Human neutrophils do not express purinergic P2X7 receptors. *Purinergic Signalling*, 6(3), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9178-7>
- MARTÍNEZ-CUESTA, M. Á., BLANCH-RUIZ, M. A., ORTEGA-LUNA, R., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., & ÁLVAREZ, Á. (2020). Structural and functional basis for understanding the biological significance of P2X7 receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8454. <https://doi.org/10.3390/ijms21228454>
- MAUGERI, N., ROVERE-QUERINI, P., EVANGELISTA, V., COVINO, C., CAPOBIANCO, A., BERTILACCIO, M. T. S., PICCOLI, A., TOTANI, L., CIANFLONE, D., MASERI, A., & MANFREDI, A. A. (2009). Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a

- phosphatidylserine, P-selectin, and β_2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood*, 113(21), 5254–5265. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-180794>
- MCCARTHY, A. E., YOSHIOKA, C., & MANSOOR, S. E. (2019). Full-length P2X7 structures reveal how palmitoylation prevents channel desensitization. *Cell*, 179(3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>
- MOHANTY, J. G., RAIBLE, D. G., MCDERMOTT, L. J., PELLEG, A., & SCHULMAN, E. S. (2001). Effects of purine and pyrimidine nucleotides on intracellular Ca²⁺ in human eosinophils: activation of purinergic P2Y receptors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(5), 849–855. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114658>
- MOLLINEDO, F., BORREGAARD, N., & BOXER, L. A. (1999). Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunology Today*, 20(12), 535–537. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(99\)01500-5](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(99)01500-5)
- MUSCHTER, S., BERTHOLD, T., BHARDWAJ, G., HAMMER, E., DHOPLE, V. M., WESCHE, J., REIL, A., BUX, J., BAKCHOUL, T., STEIL, L., GREINACHER, A., & VÖLKER, U. (2015). Mass spectrometric phosphoproteome analysis of small-sized samples of human neutrophils. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 451(Pt B), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.09.030>
- OZEN, M., XIE, H., SHIN, N., AL YOUSIF, G., CLEMENS, J., MCLANE, M. W., LEI, J., & BURD, I. (2020). Magnesium sulfate inhibits inflammation through P2X7 receptors in human umbilical vein endothelial cells. *Pediatric Research*, 87(3), 463–471. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0557-7>
- PELEGRIN, P. (2021). P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochemical Pharmacology*, 187(114385), 114385. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114385>
- PENG, K., LIU, L., WEI, D., LV, Y., WANG, G., XIONG, W., WANG, X., ALTAF, A., WANG, L., HE, D., WANG, H., & QU, P. (2015). P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(5), 1179–1188. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2129>
- PÉREZ, R. F. (2022). Efecto del ATP sobre la agregación plaquetaria en sangre entera. Departamento de Farmacología, Universidad de Valencia.
- THERMOFISHER.COM (n.d.). Pierce™ BCA protein assay kits. Retrieved July 16, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/23227>
- RALEVIC, V., & BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–492. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9755289/>
- RALEVIC, V. (2021). Purinergic signalling in the cardiovascular system—a tribute to Geoffrey Burnstock. *Purinergic Signalling*, 17(1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09734-x>
- RAYES, J., BOURNE, J. H., BRILL, A., & WATSON, S. P. (2020). The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 4(1), 23–35. <https://doi.org/10.1002/rth2.12266>
- ROGER, S., MEI, Z.-Z., BALDWIN, J. M., DONG, L., BRADLEY, H., BALDWIN, S. A., SURPRENANT, A., & JIANG, L.-H. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *Journal of Psychiatric Research*, 44(6), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.10.005>

- ROSALES, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- SANDOO, A., VAN ZANTEN, J. J. C. S. V., METSIOS, G. S., CARROLL, D., & KITAS, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4(1), 302–312. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
- SATHANOORI, R., SWÄRD, K., OLDE, B., & ERLINGE, D. (2015). The ATP receptors P2X7 and P2X4 modulate high glucose and palmitate-induced inflammatory responses in endothelial cells. *PloS One*, 10(5), e0125111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125111>
- SAVIO, L. E. B., DE ANDRADE MELLO, P., DA SILVA, C. G., & COUTINHO-SILVA, R. (2018). The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>
- SCHACHTER, J., MOTTA, A. P., DE SOUZA ZAMORANO, A., DA SILVA-SOUZA, H. A., GUIMARÃES, M. Z. P., & PERSECHINI, P. M. (2008). ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 19), 3261–3270. <https://doi.org/10.1242/jcs.029991>
- SCHÄFER, W., STÄHLER, T., PINTO ESPINOZA, C., DANQUAH, W., KNOP, J. H., RISSIEK, B., HAAG, F., & KOCH-NOLTE, F. (2022). Origin, distribution, and function of three frequent coding polymorphisms in the gene for the human P2X7 ion channel. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1033135. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1033135>
- SLUYTER, R. (2017). The P2X7 receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1051, 17–53. https://doi.org/10.1007/5584_2017_59
- SLUYTER, R., ADRIOUCH, S., FULLER, S. J., NICKE, A., SOPHOCLEOUS, R. A., & WATSON, D. (2023). Animal models for the investigation of P2X7 receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8225. <https://doi.org/10.3390/ijms24098225>
- STYRT, B. (1989). Species variation in neutrophil biochemistry and function. *Journal of Leukocyte Biology*, 46(1), 63–74. <https://doi.org/10.1002/jlb.46.1.63>
- SUH, B. C., KIM, J. S., NAMGUNG, U., HA, H., & KIM, K. T. (2001). P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *The Journal of Immunology*, 166(11), 6754–6763. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6754>
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A., & BUELL, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- TAM, S. W., HUFFER, K., LI, M., & SWARTZ, K. J. (2023). Ion permeation pathway within the internal pore of P2X receptor channels. *ELife*, 12, e84796. <https://doi.org/10.7554/eLife.84796>
- URBINA-TREVIÑO, L., VON MÜCKE-HEIM, I.-A., & DEUSSING, J. M. (2022). P2X7 receptor-related genetic mouse models - tools for translational research in psychiatry. *Frontiers in Neural Circuits*, 16, 876304. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.876304>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2020). The top 10 causes of death. Retrieved July 24, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

- VALDECANTOS, P., BRIONES, R., MOYA, P., GERMAIN, A., & HUIDOBRO-TORO, J. P. (2003). Pharmacological identification of P2X₁, P2X₄ and P2X₇ nucleotide receptors in the smooth muscles of human umbilical cord and chorionic blood vessels. *Placenta*, 24(1), 17–26. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0862>
- VAUGHAN, K. R., STOKES, L., PRINCE, L. R., MARRIOTT, H. M., MEIS, S., KASSACK, M. U., BINGLE, C. D., SABROE, I., SURPRENANT, A., & WHYTE, M. K. B. (2007). Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y₁₁ receptor. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8544–8553. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8544>
- WANG, J., & YU, Y. (2016). Insights into the channel gating of P2X receptors from structures, dynamics and small molecules. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), 44–55. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.127>
- WANG, L., OSTBERG, O., WIHLBORG, A.-K., BROGREN, H., JERN, S., & ERLINGE, D. (2003). Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 1(2), 330–336. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00070.x>
- WEBB, T. E., SIMON, J., KRISHEK, B. J., BATESON, A. N., SMART, T. G., KING, B. F., BURNSTOCK, G., & BARNARD, E. A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Letters*, 324(2), 219–225. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81397-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81397-j)
- WILEY, J. S., SLUYTER, R., GU, B. J., STOKES, L., & FULLER, S. J. (2011). The human P2X₇ receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, 78(5), 321–332. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01780.x>
- WILSON, H. L., VARCOE, R. W., STOKES, L., HOLLAND, K. L., FRANCIS, S. E., DOWER, S. K., SURPRENANT, A., & CROSSMAN, D. C. (2007). P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells: P2X receptors and IL-1/IL-1Ra in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 151(1), 96–108. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707213>
- WONG, J., GU, B. J., TEOH, H., KRUPA, M., MONIF, M., SLEE, M., & WILEY, J. S. (2022). Flow cytometry identifies an early stage of platelet apoptosis produced by agonists of the P2X₁ and P2X₇ receptors. *Platelets*, 33(4), 621–631. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1981844>
- XIE, Y., CHEN, X., LI, Y., CHEN, S., LIU, S., YU, Z., & WANG, W. (2022). Transforming growth factor- β 1 protects against LPC-induced cognitive deficit by attenuating pyroptosis of microglia via NF- κ B/ERK1/2 pathways. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02557-0>

8. ANEXOS

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.			X	
ODS 5. Igualdad de género.			X	
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.			X	
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.			X	
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.			X	
ODS 12. Producción y consumo responsables.			X	
ODS 13. Acción por el clima.X			X	
ODS 14. Vida submarina.			X	
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.			X	
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.		X		

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

ANEXO II. ESPECIFICACIONES ANTICUERPO AB93354


abcam

Product datasheet

Anti-P2X7 antibody ab93354

★★★★★ [2 Abreviews](#) [7 References](#) [1 Image](#)

Overview

Product name	Anti-P2X7 antibody
Description	Goat polyclonal to P2X7
Host species	Goat
Tested applications	Suitable for: WB, IHC-P
Species reactivity	Reacts with: Human Predicted to work with: Mouse, Rat, Guinea pig, Dog 
Immunogen	Synthetic peptide corresponding to Human P2X7 aa 13-26 (N terminal) (Cysteine residue). Sequence: YETNKVTRIQSMNY Run BLAST with Run BLAST with
Positive control	WB: Human brain frontal cortex lysate.
General notes	<p>The Life Science industry has been in the grips of a reproducibility crisis for a number of years. Abcam is leading the way in addressing this with our range of recombinant monoclonal antibodies and knockout edited cell lines for gold-standard validation. Please check that this product meets your needs before purchasing.</p> <p>If you have any questions, special requirements or concerns, please send us an inquiry and/or contact our Support team ahead of purchase. Recommended alternatives for this product can be found below, along with publications, customer reviews and Q&As</p>

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C. Avoid freeze / thaw cycles.
Storage buffer	pH: 7.30 Preservative: 0.02% Sodium azide Constituents: 0.5% BSA, Tris buffered saline
Purity	Immunogen affinity purified
Purification notes	Purified from goat serum by ammonium sulphate precipitation followed by antigen affinity chromatography using the immunizing peptide.
Clonality	Polyclonal

1

Isotype IgG

Applications

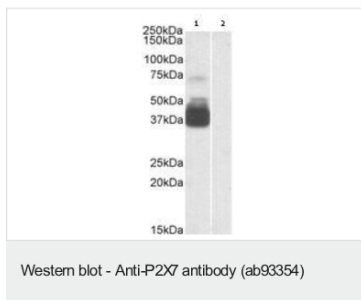
The Abpromise guarantee Our **Abpromise guarantee** covers the use of ab93354 in the following tested applications. The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
WB	★★★★☆ (2)	Use a concentration of 1 - 3 µg/ml. Detects a band of approximately 37, 70 kDa (predicted molecular weight: 69 kDa). 1 hour primary incubation is recommended for this product.
IHC-P		Use a concentration of 3 - 6 µg/ml. Perform heat mediated antigen retrieval with citrate buffer pH 6 before commencing with IHC staining protocol.

Target

Function	Receptor for ATP that acts as a ligand-gated ion channel. Responsible for ATP-dependent lysis of macrophages through the formation of membrane pores permeable to large molecules. Could function in both fast synaptic transmission and the ATP-mediated lysis of antigen-presenting cells.
Tissue specificity	Widely expressed with highest levels in brain and immune tissues.
Sequence similarities	Belongs to the P2X receptor family.
Post-translational modifications	Phosphorylation results in its inactivation. ADP-ribosylation at Arg-125 is necessary and sufficient to activate P2RX7 and gate the channel. Palmitoylation of several cysteines in the C-terminal cytoplasmic tail is required for efficient localization to cell surface.
Cellular localization	Cell membrane.

Images



All lanes : Anti-P2X7 antibody (ab93354) at 0.3 µg/ml

Lane 1 : Human brain frontal cortex lysate

Lane 2 : Human brain frontal cortex lysate with Immunising peptide

Lysates/proteins at 35 µg per lane.

Developed using the ECL technique.

Predicted band size: 69 kDa

Observed band size: 37,70 kDa

Detected by chemiluminescence.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery
- Response to your inquiry within 24 hours

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <https://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors

ANEXO III. ESPECIFICACIONES ANTICUERPO P9122

16/7/23, 8:50

Anti-Purinergic Receptor P2X7 (extracellular) antibody produced in rabbit affinity isolated antibody, lyophilized powder

My Research Folder



Introduzca el nombre de producto, el número de lote, etc.



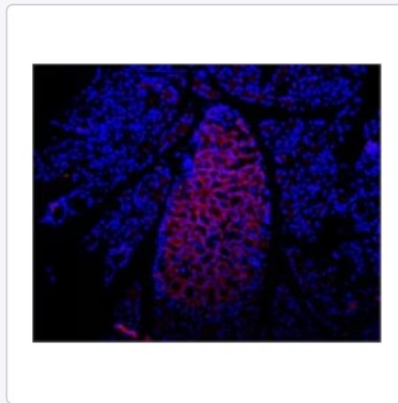
[← Atrás](#) [🏠](#)

P9122 ▶ **Sigma-Aldrich.**

Anti-Purinergic Receptor P2X₇ (extracellular) antibody produced in rabbit

★★★★★ (0) [Escriba un reseña](#)

affinity isolated antibody, lyophilized powder



[Todas las fotos \(2\)](#)

Comentarios

Sinónimos:
Anti-P2Z

Número MDL:
MFCD06798527

NACRES:
NA.41

Select an Option

Número de referencia del producto (SKU)

P9122-200UL



<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/p9122>

1/8



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Anti-Purinergic Receptor P2X7 (extracellular) (P2Z)

Developed in Rabbit, Affinity Isolated Antibody

Product Number **P 9122**

Product Description

Anti-Purinergic Receptor P2X7 is developed in rabbit using a synthetic peptide KKGWMDPQSKGIQTGRC corresponding to residues 136-152 of mouse P2X7 receptor as the immunogen. The epitope is identical in human and rat; in bovine, 14/17 residues are identical. The antibody was affinity isolated on immobilized immunogen.

Anti-Purinergic Receptor P2X7 specifically recognizes purinergic receptor P2X7 protein in rat brain lysate and human cell lines: K562 (Chronic myelogenous leukemia); WEHI-231 (Lymphoma, B lymphocyte) and HL-60 (promyelocytic leukemia), by immunoblotting.

The P2X receptors belong to the ligand-gated ion channel family and are activated by extracellular ATP. The P2X receptors family consists of at least seven isoforms: P2X1-P2X7.^{1,2,3} All P2X subunits can assemble to form homomeric or heteromeric functional channels with the exception of P2X6, which only seems to function as part of a heteromeric complex.^{4,9} The P2X7 receptor is found in cells of the immune system, particularly antigen presenting cells, and microglia. The P2X7 receptor mediates the release of proinflammatory cytokines, stimulation of transcription factors and may also have an important role in apoptosis.⁵

In the CNS, P2X receptors are involved in sensory transmission, sensory-motor integration, motor and autonomic control and overall CNS homeostasis.¹⁰ Further, P2X receptors are implicated in modulating cortical plasticity, such as hippocampal plasticity.¹¹ Recent evidence suggests that P2X receptors in the spinal cord facilitate GABA release and may be important in processing nociceptive information.¹² Peripherally, P2X receptors modulate processes involved in the physiological turnover of squamous epithelial cells¹³ and also modulate osteoclasts to stimulate bone resorption.¹⁴

The P2X receptors in spinal cord may be implicated in the induction or mediation of prolonged persistent pain.¹⁵ Further, there may be a fine balance between function and disease with P2X modulation of cellular proliferation and apoptosis.^{16,17}

Recent advances have allowed researchers to begin to learn about the structure and function of these purinergic receptors. However, much remains to be determined about their precise cellular localization, *in vivo* physiological roles, roles in disease states and possible routes to modulate their structure/function to ameliorate effects of disease.

Reagents

The antibody is supplied lyophilized from phosphate buffered saline, pH 7.4, with 1% bovine serum albumin, and 0.05 % sodium azide as preservative.

Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content, a material safety data sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazardous and safe handling.

Preparation Instructions

Reconstitute the lyophilized vial with 0.05 ml or 0.2 ml deionized water, depending on the package size purchased. Antibody dilutions should be made in buffer containing 1% bovine serum albumin.

Storage/Stability

Lyophilized powder can be stored intact at room temperature for several weeks. For extended storage, it should be stored at -20 °C or below. The reconstituted solution can be stored at 2-8 °C for up to 2 weeks. For longer storage, freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended.

If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use. Centrifuge all antibody preparations before use (10000 x g 5 min). Working dilution samples should be discarded if not used within 12 hours.

Product Profile

The recommended working dilution is (1:200) for immunoblotting.

Note: In order to obtain best results in different techniques and preparations we recommend determining optimal working concentration by titration test.

References

1. Prasad, M., et al., J. Physiol., **573**, 667 (2001).
2. Florenzano, F., et al., Neuroscience, **115**, 425 (2002).
3. Ashcroft, F.M., et al., Ion Channels and Disease Ed 1, (2000).
4. Khakh, B.S., et al., Pharmacol Rev., **53**, 107 (2001).
5. Ding, Y., et al., J. Auton. Nerv. Syst., **81**, 289 (2000).
6. Le, K.T., et al., J. Neurosci., **18**, 7152 (1998).
7. Robertson, S.J., et al., Curr. Opin. Neurol., **11**, 378 (2001).
8. Dunn, P.M., et al., Prog. Neurobiol., **65**, 107 (2001).
9. Kim, M., et al., EMBO J., **20**, 6347 (2001).
10. Kanijan, R. et al., J. Comp. Neurol., **407**, 11 (1999).
11. Inoue, K., Pharmacol. Res., **38**, 323 (1998).
12. Hugel, S. and Schlichter, R., J., Neurosci., **20**, 2121(2000).\
13. Groschel-Stewart, U. et al., Cell Tissue Res., **296**, 599 (1999).
14. Naemsch, L.N. et al., J. Cell Sci., **112**, 4425 (1999).
15. Zheng, J.H. and Chen, J., Neurosci. Lett., **7**, 41 (2000).
16. Harada, H. et al., Kidney Int., **57**, 949 (2000).
17. Coutinho-Silva, R. et al., Am. J. Physiol., **276**, C1139 (1999).

MCT/PHC 10/04

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ANEXO IV. ESPECIFICACIONES ANTICUERPO APR-008 ANÁLOGO DEL P9122

24/7/23, 15:21 Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody | KO Validated | Alomone Labs

My Research Folder Free shipping starts now, no minimum, no coupons required!

alomone labs
empowering the spirit of science

Products **Free Sample Program** Services Resources About Contact

Home > Products > Ion Channels > Ligand-Gated Ion Channels > Purinergic (P2X) Receptors > Antibodies to P2X Receptors

KO VALIDATED ✓

Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody

Purinergic receptor P2X7, P2RX7, P2Z, ATP receptor

Applications Specifications Scientific Background

Overview

Cat #: APR-008 107 Citations

Host: Rabbit
Type: Polyclonal
Form: Lyophilized

Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody (#APR-008) is a highly specific antibody directed against an extracellular epitope of the mouse protein. The antibody can be used in western blot, indirect flow cytometry, immunohistochemistry, live cell imaging, and immunocytochemistry applications. It has been designed to recognize P2X7 purinergic receptor from mouse, rat, and human samples.

[Certificate of Analysis](#) [SDS](#)

Applications: ICC, IF, IFC, IHC, LCI, WB Reactivity: H, M, R

May also work in: IP

Application key: CBE- Cell-based ELISA, FC- Flow cytometry, ICC- Immunocytochemistry, IE- Indirect ELISA, IF- Immunofluorescence, IFC- Indirect flow cytometry, IHC- Immunohistochemistry, IP- Immunoprecipitation, LCI- Live cell imaging, NI- Neutralization, WB- Western blot
Species reactivity key: H- Human, M- Mouse, R- Rat

P2X7R/CD11b
Naive PTD 14

P2X7R/GFAP
PTD 14 PTD 14

Sham Cancer
Naive 7d 14d 21d 7d 14d 21d

P2X7R
GAPDH

Expression and upregulation of microglial P2X7 receptor in cancer.
A. Immunohistochemical staining of rat spinal dorsal horn using **Anti-P2X7 Antibody** (#APR-004) or **Anti-P2X7 (extracellular) Antibody** (#APR-008) shows that P2X7 co-localizes with CD11b, a microglia marker (two panels) and not with NeuN, a neuronal marker (lower right panel). Specificity of the antibody was tested on P2X7 knock-out mice (western blot, in upper panel). B. Western blot analysis of rat dorsal horn lysates shows that P2X7 expression increases on post-tumor day 14 (PTD 14).
Adapted from Yang, Y. et al. (2015) with permission of the Society for Neuroscience.

Specific Control Product

[P2X7 Receptor \(extracellular\) Blocking Peptide \(#BLP-PR008\)](#)

ADD TO CART

Related Products

Products for control experiments

- Anti-P2X7 Receptor Antibody (#APR-004).** This antibody recognizes a different epitope and thus can also be used as a control for detecting P2X7.
- Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-ATTO Fluor-550 Antibody (#APR-004-AO).** A fluorescent primary antibody. It can be used in multiplex staining studies in conjunction with any of our antibodies raised in rabbit.
- Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-ATTO Fluor-488 Antibody (#APR-008-AG).** A fluorescent primary antibody. It can be used in colocalization studies in conjunction with any of our antibodies raised in rabbit.
- Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-ATTO Fluor-633 Antibody (#APR-008-FR).** A fluorescent primary antibody. It can be used in multiplex staining studies in conjunction with any of our antibodies raised in rabbit.

Antibodies for live cell flow cytometry experiments

- Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-FITC Antibody (#APR-008-F).** This FITC-conjugated antibody can be used to detect P2X7 in live

Product Options:

- 25 µl €467
- 50 µl €573
- 0.2 ml €667

1 **ADD TO CART**

[Bulk / Customized order](#) [Generate a Quote](#)

https://www.alomone.com/p/anti-p2x7-receptor-extracellular/APR-008

14

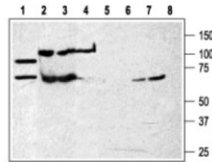
My Research Folder



Free shipping starts now, no minimum, no coupons required!

Applications

Western blot

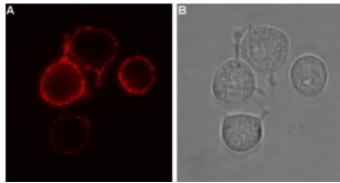


Western blot analysis of rat brain membranes (lanes 1 and 5) and human K562 chronic myelogenous leukemia cell line (lanes 2 and 6) and Mouse WEHI-231 B cell lymphoma (lanes 3 and 7) and human HL-60 promyelocytic leukemia cell line (lanes 4 and 8):

1-4. Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody (#APR-008), (1:200).

5-8. Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody, preincubated with P2X7 Receptor (extracellular) Blocking Peptide (#BLP-PR008).

Live cell imaging / Immunocytochemistry

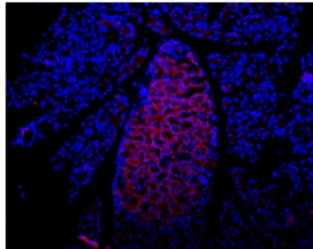


Expression of P2RX7 in rat RBL cells

Cell surface detection of P2RX7 in intact living rat basophilic leukemia (RBL) cells. A.

Extracellular staining of cells using Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody (#APR-008), (1:100) followed by goat anti-rabbit-AlexaFluor-594 secondary antibody (red). B. Live view of the cells.

Immunohistochemistry



Expression of P2RX7 in rat pancreas

Immunohistochemical staining of rat pancreas frozen section using Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody (#APR-008), (1:100), followed by mouse anti-rabbit-AlexaFluor-594 secondary antibody (red). Staining is present in endocrine cells of the *Isle of Langerhans*. Hoechst 33342 is used as the counterstain.

Immunocytochemistry

Mouse P2X7 transfected in CHO cells (1:500). (Adriouch, S., et al. (2005) *Cell. Immunol.* 236, 72.).

antibody can be used to detect P2X7 in live cell flow cytometry.

Antibodies for live cell imaging experiments

1. Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-ATTO Fluor-488 Antibody (#APR-008-AG). This antibody is the conjugated version of #APR-008 and can be used to detect P2X7 in live cells.
2. Anti-P2X7 Receptor (extracellular)-ATTO Fluor-633 Antibody (#APR-008-FR). This antibody is the conjugated version of #APR-008 and can be used to detect P2X7 in live cells.

General Protocols

[Blocking Peptides – Controls for better results](#)

[Blocking Peptide Protocol for Western Blot \(WB\)](#)

[Sample Preparation for Cell Lines](#)

[Immunocytochemistry \(ICC\) Protocols for Fixed or Live Cells: Indirect and Direct Methods](#)

[Immunohistochemistry \(IHC\) Protocols for Frozen Sections: Indirect Methods](#)

[Flow Cytometry Protocols for Live Cells: Indirect and Direct Methods](#)

[Sample Preparation Protocols for Tissues](#)

[Western Blot \(WB\) Protocol](#)

Free International Shipping

Products are lyophilized and ship at room temperature - FREE OF CHARGE.

We ship worldwide within 24 hours of our next business day.

For more country-specific shipping and contact information see [Ordering & Shipping](#).

Free Sample Program

Not sure whether the product fits your experimental setup?

[Try it first!](#)

Alomone Guarantee

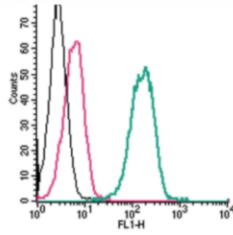
We offer 100% guarantee on all our products. If our products do not perform as stated, please contact our technical support staff.

[Alomone Guarantee information](#)

My Research Folder



Free shipping starts now, no minimum, no coupons required!



Cell surface detection of P2X7 Receptor by indirect flow cytometry in live intact human THP-1 monocytic leukemia cells:

- Cells.
- Cells + goat-anti-rabbit-FITC.
- Cells + **Anti-P2X7 Receptor (extracellular) Antibody (#APR-008)**, (2.5µg) + goat-anti-rabbit-FITC.

The control antigen is not suitable for this application.

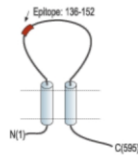
Citations (107)



Specifications



Immunogen Peptide KKGWMDPQSKGIQTGRC, corresponding to amino acid residues 136-152 of mouse P2X7 receptor (Accession [Q9Z1M0](#)). Extracellular loop.



Homology Human, rat - identical; bovine - 14/17 amino acid residues identical.

RRID AB_2040065.

Purity Affinity purified on immobilized antigen.

Form Lyophilized powder. Reconstituted antibody contains phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 1% BSA, 0.05% NaN₃.

Isotype Rabbit IgG.

Standard quality control of each lot Western blot analysis.

Peptide confirmation Confirmed by amino acid analysis and mass spectrometry.

Storage before reconstitution The antibody ships as a lyophilized powder at room temperature. Upon arrival, it should be stored at -20°C.

Reconstitution 25 µl, 50 µl or 0.2 ml double distilled water (DDW), depending on the sample size.

Free shipping starts now, no minimum, no coupons required!

My Research Folder

Concentration after reconstitution

Storage after reconstitution

The reconstituted solution can be stored at 4°C for up to 1 week. For longer periods, small aliquots should be stored at -20°C. Avoid multiple freezing and thawing. Centrifuge all antibody preparations before use (10000 x g 5 min).

Scientific Background



Resources

Regulatory Aspects of mGluRs

Ionotropic ATP (P2X) Receptors

P2X7 Receptors

Need Help With This Product?

Our reagent specialists are here to help you find the best product for your application. Please message us and we will be happy to help you find the right product for the job.

[Contact Us](#)

