



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

Programa de Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**Evaluación de receptores purinérgicos en pacientes con
COVID-19**

Tesis que para obtener el título de
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Urbina Rodríguez Rubén Omar

San Luis Potosí, S.L.P. Septiembre 2023

El programa de **Maestría en Ciencias Farmacobiológicas** de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), con **registro 003382**, categorizado en el **nivel 1**.

Proyecto realizado en: Laboratorio de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de: Beca-Tesis de CONAHCyT con número de registro 804471 (CVU 1144257).



Evaluación de receptores purinérgicos en pacientes con COVID-19 por Urbina Rodríguez Rubén Omar se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

La versión completa del presente trabajo fue sometida a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com.es>). El informe de originalidad reporta un 19% de similitud.

Evaluación de receptores purinérgicos en pacientes con COVID-19

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

ÍNDICE DE SIMILITUD

INTEGRANTES DEL JURADO

Dra. Eneida Turiján Espinoza
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Presidente

Dra. Mariana Haydee García Hernández
Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (UIBMZ)
Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, Zacatecas

Secretaria

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Sinodal

Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Sinodal

SUBCOMITÉ DE TESIS

Directora de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Profesora Investigadora de Tiempo Completo
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Co-Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Profesor Investigador de Tiempo Completo
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Asesora Interna del PCFB

Dra. Eneida Turiján Espinoza
Profesora Investigadora
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Asesora Externa del PCFB

Dra. Mariana Haydee García Hernández
Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (UIBMZ)
Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, Zacatecas.

Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

PRESENTE

Por medio de la presente, comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de maestría del PCFB, Q.F.B. **Rubén Omar Urbina Rodríguez**, titulada **"Evaluación de receptores purinérgicos en pacientes con COVID-19"** ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día **29 de septiembre de 2023 a las 10:00 horas** en el auditorio G203 de la facultad.

Atentamente:

Directora de tesis
Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Profesora Investigadora de la FCQ UASLP

Co-director de tesis
Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Profesor Investigador de la FCQ UASLP

Asesora del PCFB
Dra. Enaida Turiján Espinoza
Profesora Investigadora de la FCQ UASLP

Asesora externa
Dra. Mariana Haydee García Hernández
Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas

DEDICATORIA

*“A todas aquellas personas que
no alcanzaron a ver el fin de la pandemia”*

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, en especial a la Dra. Diana, por todo el apoyo brindado a pesar de las adversidades en la realización del proyecto, por aceptarme dentro de su equipo de trabajo y por la ayuda en poder acudir al congreso de Inmología.

A la Dra. Eneida por siempre estar disponible ante mis dudas, principalmente en el área de citometría.

A la Dra. Mariana Haydee por las facilidades brindadas en la obtención de las muestras. Al Dr. Juan Manuel por el apoyo en la adquisición de los reactivos.

Al Dr. Ernesto Martínez, por su asesoría en el área de Biología Molecular, además de su apoyo en todo momento durante el desarrollo experimental.

A la Q.F.B. Dalila por su apoyo durante el muestreo de controles. A la médico Euan, por su ayuda en la obtención de las muestras de los pacientes.

A mis compañeros DPPP en el CICSaB con los que pude convivir durante mi estancia: Víctor, Ossiel, Ignacio, Daniel, Reyes y Andrea.

Al personal del CICSaB, una disculpa por siempre llegar tan temprano.

A CONAHCyT por el apoyo monetario durante toda la maestría.

Al Dr. Fidel y Dra. Milán, por su apoyo a poder entrar a la maestría.

Al team COVID-19 del Proyecto Profesionalizante: Liz, Diana y Edgar. Gracias a ustedes el proyecto llegó más lejos. La mejor presentación de los PP, sin duda.

A mis amigas Q.F.B.s Mónica Córdova, Ana y Daniela. Gracias por todos sus consejos y buenos momentos. Amistades así son para toda la vida.

A mi novia, Mónica Nambo. Gracias por estar en todo momento, en las buenas y en las malas. Sabes que este trabajo también es tuyo. Te amo.

RESUMEN

Durante COVID-19 el ATP liberado por el tejido pulmonar dañado puede interactuar con los receptores purinérgicos y modificar la respuesta inmune. Debido a su modulación en la respuesta inflamatoria, la actividad purinérgica puede representar un factor de riesgo en los pacientes. En este trabajo se evaluaron perfiles purinérgicos P2X₁, P2X₄, P2X₇ y PA_{2A} en células mononucleares de sangre venosa periférica de 22 pacientes con COVID-19 y 10 sujetos control, por citometría de flujo y qPCR y su relación con parámetros metabólicos y antropométricos. Los resultados demuestran la importancia de los perfiles P2X₇ y PA_{2A} durante la enfermedad y parámetros antropométricos y metabólicos como el índice de masa corporal y concentraciones de colesterol LDL.

Palabras clave: COVID-19, receptores purinérgicos, SARS-CoV-2, citometría de flujo, qPCR

Summary

During COVID-19, ATP released from damaged lung tissue can interact with purinergic receptors and modify the immune response. Due to its modulation in the inflammatory response, purinergic activity may represent a risk factor in patients. In this work, P2X₁, P2X₄, P2X₇ and PA_{2A} purinergic profiles were evaluated in peripheral venous blood mononuclear cells from 22 patients with COVID-19 and 10 control subjects, by flow cytometry and qPCR and their relationship with metabolic and anthropometric parameters. The results demonstrate the importance of the P2X₇ and PA_{2A} profiles during the disease and anthropometric and metabolic parameters such as body mass index and LDL cholesterol concentrations.

Keywords: COVID-19, purinergic receptors, SARS-CoV-2, flow cytometry, qPCR

Índice general

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	1
2.1. Señalización purinérgica.....	1
2.2. Receptores P2X.....	3
2.3. Receptores P2Y.....	7
2.4. Receptores P1.....	7
2.5. SARS-CoV-2 y COVID-19.....	8
2.6. Interacción purinérgica en COVID-19.....	10
III. Justificación	12
IV. Hipótesis.....	13
V. Objetivos.....	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos específicos.....	13
VI. Metodología.....	13
6.1. Muestreo	13
6.1.1 Tipo de muestreo.....	13
6.1.2. Cálculo del tamaño de la muestra (n)	13
6.2. Criterios de participación	14
6.2.1. Criterios de inclusión para pacientes	14
6.2.2. Criterios de inclusión para sujetos control.....	14
6.2.3. Criterios de no inclusión	14
6.2.4. Criterios de eliminación	15
6.3. Descripción y operacionalización de las variables.....	15
6.3.1. Variables dependientes	15
6.3.2. Variables independientes.....	15
6.3.3. Variables confusoras	15
6.3.4. Operacionalización de las variables.....	15
6.4. Consideraciones bioéticas	21
6.5. Lugar de realización.....	21
6.6. Obtención de parámetros antropométricos	21
6.7. Procesamiento de la muestra.....	22

6.7.1 Obtención de la muestra sanguínea.....	22
6.7.2 Obtención y análisis de suero	22
6.7.3 Obtención de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC).....	22
6.7.4 Congelación y descongelación de PBMC.....	23
6.7.5 Extracción de RNA	23
6.7.6 RT y qPCR.....	24
6.7.7 Expresión relativa de los receptores purinérgicos.....	25
6.7.8 Marcaje y análisis de receptores purinérgicos en PBMC por citometría de flujo 25	
6.7.9 Estrategia de lectura por citometría de flujo.....	26
6.8. Diseño estadístico.....	26
6.9 Delimitación y limitaciones.....	27
7.2. Discusión	27
7.3. Conclusiones.....	35
VIII. Bibliografía	37
X. Glosario	53

I. Introducción

La enfermedad de COVID-19 ha representado un problema de salud importante en la época reciente, generando cambios sociales y educativos importantes. Si bien se ha decretado el fin de la pandemia por COVID-19, es importante entender que la amenaza de un posible rebrote es latente. Por ende, la información relacionada a esta patología se basa en identificar características de los pacientes que derivan en complicaciones clínicas y agravamiento de la enfermedad, lo que conduce a su vez a tiempos prolongados de hospitalización y una demanda mayor de gasto público y privado, además de una disminución en la calidad de vida. Estas características pueden incluir la presencia de comorbilidades metabólicas que en conjunto pueden modificar la respuesta inmune frente al virus en poblaciones vulnerables. Por lo anterior, el estudio de la relación inmunológica y estados metabólicos podrían ser útiles para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento esta enfermedad, además se busca el uso de nuevas estrategias que permitan la identificación rápida y no invasiva de estos parámetros. En este trabajo se analizó la relación de los receptores purinérgicos en células inmunes de sangre venosa de pacientes con COVID-19 y distintos parámetros antropométricos y de bioquímicos que pueden condicionar la condición clínica, además de proponer el potencial uso terapéutico de estas moléculas durante la enfermedad de COVID-19.

II. Antecedentes

2.1. Señalización purinérgica

De manera fisiológica en el ser humano, el ATP se encuentra en el compartimento intracelular en concentraciones de 1-10 mM y cumple con múltiples actividades energéticas. Por otro lado, en el espacio extracelular se alcanzan concentraciones mucho menores y es en este microambiente donde el ATP posee actividades de neurotransmisor a nivel simpático, además de participar en el proceso nociceptivo y activador de inflamación. Dicha liberación puede ocurrir por vías de exocitosis o bien de manera controlada y constitutiva por cambios de carga iónica a través de canales

permeables a ATP de tipo panexina₁₋₃ (Ruan, Orozco, & Du, 2020) (Allard, Longhi, Robson, & Stagg, 2017).

La actividad del ATP en el espacio extracelular es dependiente de procesos de degradación por ectoenzimas, CD39 y CD73, además de su unión a los llamados receptores purinérgicos. La señal purinérgica es crucial para llevar a cabo numerosos procesos como proliferación, diferenciación y muerte celular. Bajo condiciones de homeostasis, el ATP extracelular es rápidamente hidrolizado a adenosín difosfato (ADP) por la actividad de CD39. Esta proteína monomérica se encuentra altamente conservada en sus cinco dominios con actividad ectonucleasa y requiere de dos dominios transmembrana para mantener su actividad catalítica y afinidad por el ATP. El ADP resultante es nuevamente hidrolizado por CD39 y convertido en adenosín monofosfato (AMP) (Alcedo, Bowser, & Snider, 2021) (Allard, Longhi, Robson, & Stagg, 2017) (Díaz-García, y otros, 2022).

El ATP extracelular presenta una mayor afinidad por los receptores purinérgicos del grupo P2X. Por su parte, el ADP se une con mayor afinidad a los receptores P2Y. Los receptores P1 tienen como único ligando a la adenosina (Cekic & Linden, 2016).

El AMP es hidrolizado a adenosina y fosfato inorgánico por la ectoenzima CD73, proteína homodimérica organizada en tres dominios. El dominio N-terminal contiene el sitio de unión a metales, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico mientras que el tercer dominio es una alfa hélice corta que une al dominio N y C-terminal. Los monómeros se unen de manera no covalente por acción de dos iones de zinc, los cuales se requieren para mantener la actividad catalítica de CD73 (Allard, Longhi, Robson, & Stagg, 2017).

Además de su función como enzimas ectonucleóticas, CD39 y CD73 se han estudiado como marcador de maduración y diferenciación en linfocitos T. Existe una nula expresión de CD39 y una alta expresión de CD73 en el caso de los linfocitos T vírgenes. En contraste, en linfocitos T efectores se pierde CD73 y aumenta la presencia de CD39 en la membrana celular. Tanto en linfocitos T de memoria central,

como en linfocitos T de memoria efectora, la célula coexpresa de manera conjunta CD39 y CD73 (Bono, Fernández, Flores-Santibañez, Roseblatt, & Sauma, 2015).

Estudios muestran asociaciones entre la desregulación de esta señalización y patologías como distintos tipos de cáncer, alteraciones neurodegenerativas, enfermedad de la gota, hiperglicemia y alteraciones de las vías urinarias, convirtiéndose en potenciales dianas terapéuticas para el control de éstas (Burnstock, 2018) (Huang, y otros, 2021).

2.2. Receptores P2X

Se han descrito siete subtipos de receptores P2X, clasificados como P2X₁₋₇. Los receptores P2X consisten en dos proteínas transmembrana con una gran región extracelular. Topológicamente, los receptores P2X poseen una estructura similar con la presencia de un dominio N y C-terminal intracelular unidos por motivos de proteínas quinasas y con dos regiones transmembrana, TM1 y TM2, que participan en la activación del receptor. Estas proteínas poseen un carácter inotrópico y son permeables a iones como el Cl⁻, K⁺, Na⁺ y Ca²⁺. La activación de los receptores P2X causa un aumento súbito en la concentración intracelular de Ca²⁺, además de la salida de K⁺ y Na⁺ lo que causa la despolarización de la membrana. Derivado de la despolarización se induce la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, lo cual potencializa la entrada de Ca²⁺ a la célula promoviendo vías de señalización: MAP quinasa (MAPK), proteína C quinasa (PKC) y calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII). Los receptores P2X, en su estructura cuaternaria, suelen agruparse en forma de homotrímeros, sin embargo, se ha identificado la presencia de heterotrímeros, lo cual conduce a generar combinaciones de estos receptores, por ejemplo, P2X_{1/2}, P2X_{1/4} y P2X_{1/5}. Al igual que los demás receptores purinérgicos, los receptores de tipo P2X presentan una extensa distribución en el organismo humano, principalmente a nivel del sistema nervioso central, sin embargo, también se ha descrito su presencia en células de la respuesta inmune (He, y otros, 2021) (Montejano-Medina, Martel-Gallegos, Zarazúa-Guzmán, Reynaga-Hernández, & Rodríguez-Menchaca, 2020) (Bennetts, Mobbs, Ventura, & Thal, 2022).

El receptor P2X₁ y P2X₃, posee una alta afinidad por el ATP, ya que ambos receptores requieren concentraciones <1 μM, siendo catalogados como los receptores purinérgicos P2X más sensibles a cambios en la concentración de ATP, pero también con una alta desensibilización a esta molécula. Estas características permiten que el receptor P2X₁ pueda inducir una acumulación mayor de Ca²⁺ a nivel citoplasmático. La proteína P2X₁ posee ciclos de internalización y reciclaje a la membrana celular más rápidos en comparación con otros miembros de la familia P2X. Se ha identificado la presencia de esta proteína en cerebro, corazón, riñón, linfocitos T, mastocitos y plaquetas. Una de las más importantes funciones de P2X₁ se identificó en las células plaquetarias, en modelos murinos deletados del gen para P2X₁ se observó un aumento en la formación de trombos venosos. En células inmunes, la actividad de este receptor se ha relacionado con la activación de linfocitos T, plaquetas, mastocitos y monocitos. Alteraciones en la regulación de P2X₁ se ha asociado con cáncer de vejiga, enfermedad de Parkinson, hipertensión sistémica y renal, además de cardiopatías (Cekic & Linden, 2016) (Burnstock, 2018) (Huang, y otros, 2021) (Bennetts, Mobbs, Ventura, & Thal, 2022) (Kanellopoulos, Almeida-da-Silva, Rüttel Boudinot, & Ojcius, 2021).

Otro receptor purinérgico de importancia es P2X₄, que junto a P2X₂ y P2X₅, pertenece al grupo de receptores P2X con sensibilidad y desensibilización intermedia al ATP (3-10 μM), pero con una actividad prolongada respecto a receptores de mayor sensibilidad al ATP. Se ha identificado que P2X₄ puede ser resensibilizado en un proceso dependiente de pH en el dominio extracelular de la proteína, ya que a pH inferior a 5 se induce la separación del ATP a este receptor y que, a nivel lisosomal (pH=3.5-5), altas concentraciones de ATP no permiten la activación del receptor. Se ha identificado que P2X₄ tiene la capacidad de formar poros no selectivos en células de la microglía en modelos murinos cuando se exponen de manera prolongada a concentraciones de 100 μM de ATP. Otros estudios muestran que en macrófagos murinos deletados para el gen de P2X₇ estimulados con lipopolisacáridos y ATP, el receptor P2X₄ también puede activar vías de señalización en ausencia de P2X₇. La

formación de heterotrímeros de P2X_{4/7} se ha identificado en bajas concentraciones en células murinas y se ha sugerido que P2X₄ permite un aumento en la secreción de IL-1 β derivado de la señalización de P2X₇. La proteína P2X₄ se ha identificado en cerebro, riñón, corazón, células de la microglía, linfocitos T y mastocitos. A nivel de la respuesta inmune, la actividad de P2X₄ se ha asociado con la activación de linfocitos T, mastocitos y monocitos. Alteraciones de P2X₄ se han relacionado con cáncer de mama, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, lesión nefrotóxica, enfermedad de la gota, hipertensión e isquemia cardiaca (Cekic & Linden, 2016) (Burnstock, 2018) (Huang, y otros, 2014) (Huang, y otros, 2021) (Kanellopoulos, Almeida-da-Silva, Rützel Boudinot, & Ojcius, 2021).

El receptor P2X₇ requiere una mayor concentración de ATP (5-10 mM) para lograr su activación, además carece de desensibilización al ATP en comparación con los demás miembros del grupo P2X, por lo cual se ha denominado que actúa como una señal de alarma en sitios de daño tisular. La proteína P2X₇ contiene 595 aminoácidos aproximadamente, de los cuales 235 se encuentran en la porción C-terminal, lo cual representa 150 más aminoácidos que el resto de los receptores P2X. P2X₇ se encuentra en cerebro, riñón, vasos sanguíneos, pulmón, corazón, linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺ y T reguladores), macrófagos, linfocitos NK y células dendríticas. La función de P2X₇ se relaciona a procesos de activación celular, principalmente de linfocitos T efectores. Otra de las funciones de la activación de P2X₇ es la de inducir el ensamblaje del inflamosoma NLRP3 y en consecuencia el procesamiento dependiente de caspasa-1 para la liberación de IL-1 β . Una de las razones que explican la propiedad de activación a altas concentraciones de ATP se debe a que P2X₇ posee actividad sobre la inducción de muerte celular. La estimulación y activación constante de P2X₇ induce la formación de un macroporo no selectivo a nivel de la membrana celular por el reclutamiento y ensamblaje de complejos proteicos formados por subunidades de P2X₇. La formación del macroporo modifica la permeabilidad en la membrana, esto permite el eflujo de sustancias al espacio extracelular, incluyendo el movimiento de

ATP, lo cual provoca el aumento en las concentraciones de esta molécula a nivel extracelular, generando un bucle en la señal purinérgica.

La dualidad en la función activadora y de formación de poros se debe a que existen isoformas de P2X₇, las cuales derivan de modificaciones postranscripcionales del gen específico en la codificación de la proteína. Las isoformas A y B (P2X_{7A} y P2X_{7B}) son las mejor caracterizadas en el ser humano. Por un lado, P2X_{7A} corresponde a una variante de longitud completa, codificada por un mRNA de 13 exones y sin intrones, mientras que P2X_{7B} deriva de la presencia de un intrón entre el exón 10 y 11, esto resulta en un codón de paro prematuro causando el acortamiento de la proteína al eliminar la región C-terminal. Al convertirse en una proteína trunca, P2X_{7B} carece de la capacidad de formar macroporos, sin embargo, sigue conservando su funcionalidad como canal iónico, además de que al unirse a P2X_{7A} puede potencializar los efectos de esta última. Bajo este contexto, la variante P2X_{7A} presenta funciones promotoras de muerte celular, mientras que P2X_{7B} de sobrevida y proliferación celular.

Alteraciones en la actividad de P2X₇ se ha relacionado con daño al tejido neuronal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, glioma, esclerosis múltiple, tumores hepáticos, síndrome de riñón poliquístico, nefritis, hipertensión renal y sistémica, lesión nefrotóxica, enfermedad de la gota, aterosclerosis, trombosis, fibrosis pulmonar, enfermedad crónica respiratoria y cardiopatas, además de múltiples alteraciones a nivel del sistema nervioso central. Una de las estrategias para estudiar la actividad de P2X₇ es la de medir los niveles de CD62L soluble (CD62L_s) antes y después de la adición de ATP. CD62L es una selectina de tipo C dependiente de Ca²⁺ presente en la membrana celular, el cual juega un papel importante en la migración de linfocitos T y B, monocitos, neutrófilos y eosinófilos hacia los ganglios linfáticos periféricos. Cuando el ATP se une y activa a P2X₇, de manera intracelular se induce la activación la metaloproteasa ADAM17 que a su vez puede fragmentar a CD62L generando la porción soluble. A mayor actividad de P2X₇ se esperan menores niveles de CD62L en la membrana y una elevación en la concentración de CD62L_s. Además de CD39 y CD73, CD62L ha sido utilizado como

marcador de diferenciación celular en linfocitos T, donde las células de memoria central tienden a una sobreexpresión de CD62L, mientras que los linfocitos T de memoria efectora poseen bajos niveles de esta proteína (Arnaud-Sampaio, y otros, 2022) (Pegoraro, y otros, 2020) (He, y otros, 2021) (De Salis, y otros, 2022) (Burnstock, 2018) (Cekic & Linden, 2016) (Huang, y otros, 2021) (Bono, Fernández, Flores-Santibañez, Roseblatt, & Sauma, 2015) (Sluyter & Wiley, 2014).

2.3. Receptores P2Y

Los receptores purinérgicos P2Y (P2Y₁₋₁₄) son más afines por el ADP y se encuentra acoplados a proteínas G. Estos receptores son proteínas de 328-377 aminoácidos que atraviesan siete veces la membrana celular debido a la unión de tres segmentos intracelulares y tres extracelulares. Los receptores P2Y activan diferentes vías de carácter metabotrópico, siendo los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ los que se encuentran acoplados a proteínas G_q que activa la β-fosfolipasa y que a su vez induce la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático. P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ se encuentran acoplados a la proteína G_q que inhibe al adenilato ciclasa para disminuir la concentración de AMP cíclico celular. P2Y₁₁ participa en la activación de ambas señales. La distribución de los receptores P2Y es amplia; cerebro, riñón, vasos sanguíneos, pulmón, corazón, plaquetas, fagocitos, monocitos, linfocitos, células dendríticas, neutrófilos y células de la microglía. La actividad de los receptores P2Y se encuentra relacionada con la agregación plaquetaria, activación y quimiotaxis de células de la respuesta inmune y reducción en la liberación de ATP. Alteraciones como la enfermedad de Alzheimer, glioma, esclerosis múltiple, nefritis, lesión nefrotóxica, enfermedad de la gota, trombosis, fibrosis pulmonar, fallo cardíaco, hipertrofia e isquemia cardíacas se han relacionado con la alteración de diferentes tipos de receptores P2Y (Burnstock, 2018) (Cekic & Linden, 2016) (Huang, y otros, 2021).

2.4. Receptores P1

Los receptores P1, también conocidos como receptores PA, son proteínas transmembrana que presentan una alta afinidad por la adenosina extracelular. Actualmente se conocen 4 diferentes tipos de receptores P1; PA₁, PA₃ y PA₂, este

último con dos isoformas, PA_{2A} y PA_{2B}. Al igual que los receptores P2Y, los receptores P1 llevan a cabo sus funciones celulares al acoplarse a proteínas G. El receptor PA₃ se encuentra asociado a G_i, PA₁ a proteínas G_{i/o}, PA_{2B} a proteínas G_{s/o} y PA_{2A} a G_{s/q}. Los receptores P1 se encuentran ampliamente distribuidos en tejido nervioso, principalmente en el sistema nervioso central, aunque también en riñón, vasos sanguíneos, pulmón y cerebro. En el sistema inmune, los receptores P1 se han descrito en neutrófilos, células dendríticas inmaduras, macrófagos y mastocitos. En estas células, la función de los receptores P1 se ha relacionado con la generación de una respuesta antiinflamatoria, liberación de IL-6, desgranulación de mastocitos y disminución de la quimiotaxis de neutrófilos. Los receptores P1 poseen una actividad que contrarresta las funciones de los receptores purinérgicos del grupo P2X y P2Y. Cuando la adenosina se une a los receptores PA_{2A} y PA_{2B} se genera un aumento del AMP cíclico y activación de la proteína cinasa A, lo que conduce a limitar la respuesta inflamatoria. La isoforma PA_{2A} se expresa en niveles altos en linfocitos y plaquetas en comparación con PA_{2B} (Burnstock, 2018) (Cekic & Linden, 2016) (Huang, y otros, 2021).

2.5. SARS-CoV-2 y COVID-19

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por un virus de la familia *Coronaviridae* se ha expandido rápidamente alrededor del mundo hasta catalogarse como una pandemia. Al nuevo β -CoV identificado, se le denominó "SARS-CoV-2" por la Comisión Internacional de Clasificación de Virus (Alipoor, y otros, 2021) (Sahu, y otros, 2021) (Wu, y otros, 2020). Los coronavirus son virus de ARN de cadena monocatenaria en sentido positivo (+ssRNA) con envoltura, que se replican en el citoplasma de la célula huésped y se clasifican en cuatro géneros (α , β , γ y δ) según la filogenia (Wu, y otros, 2020) (Su, y otros, 2016). El SARS-CoV-2 contiene cuatro proteínas estructurales espiga (S), envoltura (E), membrana (M), y nucleocápside (N) y dieciséis proteínas no estructurales (Paolini, y otros, 2021).

La entrada del virus en las células del huésped es mediante la glicoproteína S, la cual es una proteína transmembrana homotrimérica (Alipoor, y otros, 2021) (Paolini, y otros,

2021). Después de unirse al receptor del huésped, S es escindida por las proteasas del huésped que activan las dos subunidades de la proteína, S1 y S2. La primera se caracteriza por poseer la función de unirse al receptor del huésped, mientras que la segunda contiene los péptidos de fusión (FP), esenciales para la fusión del virus y la membrana del huésped que completan el proceso de entrada. El principal receptor identificado para el SARS-CoV-2 es la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) presente en diferentes tipos de células, incluyendo células del sistema inmune (Alipoor, y otros, 2021) (Paolini, y otros, 2021).

El mecanismo principal de transmisión del SARS-CoV-2 es a través de fómites y gotitas durante el contacto directo estrecho y sin protección entre individuos infectados y no infectados. El virus también puede propagarse por una exposición indirecta, por ejemplo, al tocarse la boca, la nariz o los ojos. Los síntomas más comunes asociados a la neumonía viral causada por el SARS-CoV-2 son fiebre, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, mialgia, fatiga y disnea. Además, se ha informado de la pérdida del gusto o del olfato y de síntomas gastrointestinales en los pacientes (Alipoor, y otros, 2021) (Paolini, y otros, 2021).

El espectro clínico de la enfermedad COVID-19 es sumamente amplio y se presenta desde un estado clínico no grave (infección asintomática e infección leve del tracto respiratorio) hasta la condición grave (infección severa del tracto respiratorio y neumonía severa), siendo esta última variante clínica la que se presenta en cerca del 15% de los casos confirmados de COVID-19. La gravedad de la enfermedad parece estar asociada la edad, el sexo, índice de masa corporal y comorbilidades como obesidad, sobrepeso y el asma (Paolini, y otros, 2021) (Huang & Kuan, 2022). En México, se considera como COVID-19 grave a aquellos pacientes que presentan signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, respiración rápida), frecuencia respiratoria superior a 30 respiraciones por minuto, dificultad respiratoria grave y una saturación de O₂<90% (Gobierno de México, 2022)

Otra de las características que se presenta durante el desarrollo de COVID-19, principalmente en la condición grave, es la llamada tormenta de citocinas, la cual se

caracteriza por un aumento en las concentraciones de citocinas con actividad proinflamatoria como lo son IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, IL-33, IFN- γ y TNF- α , tanto a nivel tisular como sistémico (Zarei, Sahebi Vaighan, & Ziai, 2021) (Simões, y otros, 2021). Sin embargo, estudios más recientes demuestran una disminución en la expresión relativa de genes involucrados en rutas de activación por DNA viral citosólico como lo son AIM2, IFI16, STING y NF- κ B en pacientes con COVID-19 grave, lo cual podría indicar una respuesta inmune disminuida en estos pacientes (García-Hernández, y otros, 2021).

El aumento de la concentración de estas citocinas puede conducir a un estado de estrés celular, derivado de una condición de hiperinflamación, desencadenando apoptosis, piroptosis y necroptosis en las células afectadas. Estos procesos de muerte celular pueden a su vez causar la liberación de diversas moléculas hacia el espacio extracelular como adenosín trifosfato (ATP) (Alipoor, y otros, 2021) (Paolini, y otros, 2021) (Hasan, y otros, 2022).

2.6. Interacción purinérgica en COVID-19

Durante las primeras horas (fase aguda) de la infección por SARS-CoV-2 las células infectadas comienzan a producir IFN de tipo I (α y β), IL-6 y CCL2, moléculas que actúan como factores quimioatrayentes de células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos. Además, en las células infectadas, el virus puede inducir rutas de muerte celular como el marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*) 3a (ORF3a) en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis al unirse y activar a la caspasa-8. Los linfocitos T de pacientes con COVID-19 muestran un aumento en la expresión de CD95, otra proteína involucrada en la inducción de apoptosis por vía extrínseca. La infección también puede desencadenar la vía de necrosis dependiente de la proteína RIPK3, ya que esta proteína se encuentra aumentada en pacientes con COVID-19. Estas vías de muerte celular, aunado a la actividad de los canales tipo panexina, conducen al aumento de las concentraciones extracelulares de ATP provenientes de células infectadas en condición apoptótica, necrótica o de estrés.

Durante el curso temporal de la infección (fase crónica) se esperaría que los niveles de ATP disminuyan, mientras que la concentración de adenosina debería encontrarse aumentada, esto debido a la actividad de las ectoenzimas CD39 y CD73. Sin embargo, estudios han mostrado una disminución en la capacidad hidrolítica de ATP y AMP en células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC) en pacientes con COVID-19 respecto a sujetos control, el cual se relacionó con el aumento en las concentraciones de ATP extracelular y un porcentaje mayor de PBMC CD39⁺ y CD73⁺ en los pacientes. Además, los pacientes con COVID-19 severo presentan daño tisular a nivel pulmonar, neuronal y cardíaco, trombosis sistémica y un marcado estado procoagulador, alteraciones relacionadas con la actividad purinérgica. Bajo esta condición se asume que la función de los receptores purinérgicos P2X y P2Y alcanzan un pico de actividad durante la etapa de infección aguda, mientras que en un estado crónico aumenta la actividad de los receptores PA (Zarei, Sahebi Vaighan, & Ziai, 2021) (Simões, y otros, 2021) (Ribeiro, y otros, 2021) (Dos Anjos, B., Assmann, Carvalho, & Bagatini, 2020) (Sriram & Insel, 2021) (Cekic & Linden, 2016) (Sriram & Insel, 2021) (Schultz, Bertoni, & Wink, 2022) (da Silva, y otros, 2022).

Se ha reportado un aumento en la concentración de la proteína P2X₇ soluble en plasma de pacientes con COVID-19 en condiciones graves de la enfermedad en comparación con sujetos control. Además, las concentraciones plasmáticas altas de P2X₇ soluble fue en aquellos pacientes con comorbilidades, como diabetes y dislipidemias, en comparación a pacientes sin estas comorbilidades. Estos pacientes con COVID-19 con altas concentraciones de P2X₇ soluble, presentaron una recuperación menor (medido en días de hospitalización) en comparación a pacientes con una baja concentración de la proteína en plasma.

En pacientes con COVID-19 las concentraciones séricas de la proteína C reactiva, ferritina, IL-1RA, IL-6, IL-15 e IL-18 muestran una correlación positiva con las concentraciones plasmáticas de P2X₇. Este último podría relacionarse con una mayor actividad del receptor de la familia de los receptores P2X que conlleva a la liberación aumentada de citocinas proinflamatorias por las células inmunes presentes en el tejido

pulmonar y un posterior incremento de la activación del inflamosoma NLRP3 durante COVID-19. Los pacientes con COVID-19 grave presentan una mayor concentración sérica de IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α . El uso anakinra, un inhibidor de la actividad de IL-1 β , disminuyó la mortalidad y la estancia hospitalaria por COVID-19 (Zarei, Sahebi Vaighan, & Ziai, 2021) (Schultz, Bertoni, & Wink, 2022) (Cekic & Linden, 2016) (Sriram & Insel, 2021) (Díaz-García, y otros, 2022) (García-Villalba, y otros, 2022) (da Silva, y otros, 2022) (Junqueira, y otros, 2021) (Gupta, 2022) (Huet, y otros, 2020) .

III. Justificación

Al 2 de mayo de 2023 se han reportado cerca de 764, 416, 156 casos confirmados acumulados de COVID-19 a nivel mundial y 6, 914, 914 defunciones. La letalidad global de la enfermedad bajó desde un 8% en mayo de 2020 hasta 0.9% en mayo de 2023. En México hasta la misma fecha se han confirmado 7, 587, 63 casos totales y 333, 913 defunciones totales por COVID-19. Del total de casos acumulados se observa un predominio del sexo femenino (53.6%) y una mediana de edad de 38 años. El 62% de las defunciones confirmadas fueron de sexo masculino, con una mediana de edad de 64 años. La tasa de incidencia de casos acumulados es de 5, 791.9 por cada 100,000 habitantes. Se estiman 12, 182 casos activos en todo el país y una tasa de incidencia activa de 8.8 por cada 100, 000 habitantes. San Luis Potosí ocupa el quinto lugar de los Estados con mayor número de casos acumulados de COVID-19 con 255, 072, además de 359 casos activos. Con la información presentada es evidente el problema de salud que representa la COVID-19 a nivel mundial y nacional, a pesar de que se implemente un esquema de vacunación. La participación de la señal purinérgica a través de receptores P2X7, P2X1 y A2A se desconoce en poblaciones de linfocitos. Por lo tanto, resulta relevante conocer si las isoformas P2X_{7A} y P2X_{7B} y los otros miembros de la familia de receptores purinérgicos P2X, como P2X₁ y P2X₄, así como del receptor PA_{2A} durante COVID-19 son posibles blancos para ser utilizados como estrategias terapéuticas en la progresión clínica de COVID-19 (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2022) (Secretaría de Salud, 2023) (Secretaría de Salud, 2022).

IV. Hipótesis

Los receptores purinérgicos P2X₁, P2X₄ y P2X₇, al igual que la ecto-enzima CD39 se encuentran aumentados en pacientes con COVID-19 en comparación con los sujetos control, mientras que PA_{2A} se encuentra disminuido.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar los receptores purinérgicos P2X₇ (en sus isoformas P2X_{7A} y P2X_{7B}), P2X₁, P2X₄ y PA_{2A}, además de la ectoenzima CD39, en células mononucleares de sangre venosa periférica de pacientes con COVID-19 e individuos control.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión relativa P2X_{7A}, P2X_{7B}, P2X₁, P2X₄ y PA_{2A} mediante PCR en tiempo real (qPCR).
- Evaluar los niveles de CD39, P2X₇, P2X₁ y PA_{2A} por citometría de flujo en PBMC.
- Analizar la posible asociación de parámetros antropométricos y metabólicos con los datos de expresión relativa y niveles de los receptores purinérgicos P2X_{7A}, P2X_{7B}, P2X₁, P2X₄ y PA_{2A}, en PBMC de pacientes y sujetos control.

VI. Metodología

6.1. Muestreo

6.1.1 Tipo de muestreo

No probabilístico y consecutivo.

6.1.2. Cálculo del tamaño de la muestra (n)

Se considera una n de 22 pacientes con COVID-19 como parte del estudio. Lo anterior debido a que se tiene una consideración especial ya que no existen suficientes

resultados experimentales y de estudios clínicos sobre la expresión relativa y presencia de las proteínas CD39, P2X₇, P2X₁, P2X₄ y PA_{2A} en células mononucleares de sangre venosa periférica de pacientes con COVID-19.

6.2. Criterios de participación

6.2.1. Criterios de inclusión para pacientes

- Prueba de exudado nasofaríngeo por RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva.
- Sexo indistinto.
- 18 a 85 años.
- Sin diagnóstico de influenza, dengue, diabetes mellitus II, lupus eritematoso, artritis reumatoide y/o cáncer.
- Firma del consentimiento informado.

6.2.2. Criterios de inclusión para sujetos control

- Prueba de exudado nasofaríngeo por RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa.
- No presentar síntomas de COVID-19 por al menos un mes.
- Sexo indistinto.
- 18 a 85 años.
- Sin diagnóstico de influenza, dengue, diabetes mellitus II, lupus eritematoso, artritis reumatoide y/o cáncer.
- Firma del consentimiento informado.

6.2.3. Criterios de no inclusión

- Mujeres que presenten embarazo.
- Sujetos con enfermedad hepática, renal o pulmonar.
- Sujetos fumadores y/o alcohólicos.
- Sujetos que tengan uso de inmunosupresores y/o glucocorticoides.
- Sujetos que no firmen el consentimiento informado.
- Imposibilidad de obtener la muestra por punción venosa.

6.2.4. Criterios de eliminación

- Imposibilidad de procesar la muestra.
- Retiro de la carta de consentimiento a participar en el estudio.

6.3. Descripción y operacionalización de las variables

6.3.1. Variables dependientes

Expresión relativa de los genes P2X_{7A}, P2X_{7B}, P2X₁, P2X₄ y PA_{2A}.

Porcentaje de células positivas para CD39, P2X₇, P2X₁ y PA_{2A}.

6.3.2. Variables independientes

Sintomatología de los pacientes que determinan el estado clínico de COVID-19.

6.3.3. Variables confusoras

Sexo, edad y antecedentes clínicos patológicos.

6.3.4. Operacionalización de las variables

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
P2X _{7A}	Gen que codifica para la proteína del mismo nombre. Expresión relativa evaluada por qPCR	De cero a infinito	Veces de cambio con respecto al gen constitutivo β -actina	Cuantitativa continua

P2X _{7B}	Gen que codifica para la proteína del mismo nombre. Expresión relativa evaluada por qPCR	De cero a infinito	Veces de cambio con respecto al gen constitutivo β -actina	Cuantitativa continua
P2X ₁	Gen que codifica para la proteína del mismo nombre. Expresión relativa evaluada por qPCR	De cero a infinito	Veces de cambio con respecto al gen constitutivo β -actina	Cuantitativa continua
P2X ₄	Gen que codifica para la proteína del mismo nombre. Expresión relativa evaluada por qPCR	De cero a infinito	Veces de cambio con respecto al gen constitutivo β -actina	Cuantitativa continua
PA _{2A}	Gen que codifica para la proteína del mismo nombre. Expresión relativa evaluada por qPCR	De cero a infinito	Veces de cambio con respecto al gen constitutivo β -actina	Cuantitativa continua

CD39	<p>Ectoenzima que degrada ATP y ADP extracelulares.</p> <p>Porcentaje de positividad evaluada por citometría de flujo</p> <p>Expresión media evaluada por citometría de flujo</p>	De cero a infinito	<p>Porcentaje (%)</p> <p>Intensidad de fluorescencia media (MFI)</p>	Cuantitativa continua
P2X ₇	<p>Receptor purinérgico de baja afinidad por el ATP extracelular.</p> <p>Porcentaje de positividad evaluada por citometría de flujo</p> <p>Expresión media evaluada por citometría de flujo</p>	De cero a infinito	<p>Porcentaje (%)</p> <p>Intensidad de fluorescencia media (MFI)</p>	Cuantitativa continua

P2X ₁	Receptor purinérgico de afinidad intermedia por el ATP extracelular.	De cero a infinito	Porcentaje (%)	Cuantitativa continua
	Porcentaje de positividad evaluada por citometría de flujo		Intensidad de fluorescencia media (MFI)	
PA _{2A}	Expresión media evaluada por citometría de flujo	De cero a infinito	Porcentaje (%)	Cuantitativa continua
	Porcentaje de positividad evaluada por citometría de flujo		Intensidad de fluorescencia media (MFI)	
Independiente				
Sintomatología	Estado clínico del paciente (historia clínica)	No aplica	Estado clínico del paciente	Cualitativa

Variables de Control (confusoras)				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Sexo	Conjunto de características biológicas, anatómicas, fisiológicas y genéticas que definen las características del individuo	Masculino Femenino	No aplica	Cualitativa
Edad	Tiempo transcurrido desde el momento del nacimiento	18-85 años	años	Cuantitativa discreta
Enfermedades asociadas	Patologías asociadas al individuo	Diabetes, hipertensión, Obesidad, lupus eritematoso generalizado, artritis	No aplica	Cualitativa
Índice de masa corporal (IMC)	Relación del peso y talla.	De cero a infinito	kg/m ²	Cuantitativa continua

Glucosa sérica	Monosacárido sérico con propiedades metabólicas.	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua
Ácido úrico sérico	Producto de desecho del metabolismo de las purinas	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua
TGO sérica	Transaminasa de origen hepático	De cero a infinito	U.I./L	Cuantitativa continua
Proteína C reactiva	Proteína hepática de fase aguda	De cero a infinito	mg/L	Cuantitativa continua
Colesterol total sérico	Concentración total de las lipoproteínas	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua
Colesterol HDL sérico	Lipoproteína que transporta triglicéridos hacia el hígado	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua

Colesterol LDL sérico	Lipoproteína que transporta triglicéridos hacia los tejidos	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua
Triglicéridos séricos	Principal forma de almacenaje de lípidos en el humano	De cero a infinito	mg/dL	Cuantitativa continua
Grasa corporal	Masa de almacenaje lipídico	De cero a infinito	%	Cuantitativa continua

6.4. Consideraciones bioéticas

Se trata de una investigación con riesgo mínimo. Los participantes que fueron reclutados en este estudio conocieron y firmaron el consentimiento informado incluido, el cual se apega a las normas establecidas en la declaración de Helsinki vigente. Los formatos permanecen bajo resguardo.

6.5. Lugar de realización

1. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, UASLP.
2. Hospital Central, Dr. Ignacio Morones Prieto.
3. Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB). UASLP.
4. Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (UIBMZ) del Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, Zacatecas.

6.6. Obtención de parámetros antropométricos

Una vez firmado el consentimiento informado, tanto a los sujetos control como los pacientes se les solicitó información general como sexo, edad, fecha de nacimiento,

antecedentes clínicos patológicos. Además, se tomaron datos de talla, peso y perímetros corporales los cuales fueron utilizados para determinar el índice de masa corporal. El porcentaje de grasa corporal fue calculada según lo indicado por la *Navy Seal Formula* (Shaheen, y otros, 2019)

6.7. Procesamiento de la muestra

6.7.1 Obtención de la muestra sanguínea

Una vez firmado el consentimiento informado, tanto a los sujetos control como los pacientes, se realizó una venopunción para obtener la muestra sanguínea siguiendo las recomendaciones por parte del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Por cada participante se tomaron 2 tubos con EDTA y un tubo sin aditivo. Los tubos con EDTA fueron empleados para la extracción de PBMC y el tubo sin aditivo se utilizó para la extracción del suero.

6.7.2 Obtención y análisis de suero

El tubo sin aditivo fue centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue separado en campana de flujo y alicuotado en 700 μ L. Los sueros fueron congelados a -80 °C y transportados al Laboratorio de Análisis Clínicos Dr. Pedro Medina de los Santos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí donde se determinó la concentración de glucosa, ácido úrico, aspartato aminotransferasa (TGO), proteína C reactiva (PCR), colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos.

6.7.3 Obtención de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC)

Se obtuvieron PBMC a través del método de diferencia de densidad de Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.E. U.U. A.A.), en campana de bioseguridad, según lo establecido por el proveedor. Una vez aisladas las PBMC, se realizó la cuantificación de la concentración y viabilidad celular con una dilución 1:10 con azul de tripano. Sobre una placa se colocaron 10 μ L de la suspensión celular y 90 μ L de azul de tripano. Se

tomaron 10 μL de la dilución y se colocaron en una cámara de Neubauer, se contabilizaron dos cuadrantes y se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de células vivas (sin colorante), células muertas (con colorante) y células totales en el total de suspensión celular. La técnica se estandarizó para obtener valores $>90\%$ de viabilidad celular y una concentración $>1 \times 10^6$ células/ mL.

6.7.4 Congelación y descongelación de PBMC

Las PBMC aisladas fueron colocadas por goteo en medio de congelación constituido con suero bovino fetal con 10% de DMSO y fueron congeladas en alícuotas de 1×10^6 células/mL a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior descongelación. En el día de su uso, las células congeladas fueron colocadas en medio de descongelación constituido por medio RPMI+10% de suero bovino fetal precalentado a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Tras una serie de lavados se realizó la técnica antes descrita para la cuantificación de concentración y viabilidad celular. La técnica se estandarizó para obtener valores $>90\%$ de viabilidad celular y una concentración 1×10^6 células/mL. Se tomó el equivalente a 2×10^6 células/mL en medio de descongelación para la realización de la extracción de RNA y de 1×10^6 células/mL para el marcaje por citometría de flujo.

6.7.5 Extracción de RNA

La técnica se estandarizó utilizando el equivalente a 2×10^6 células/mL descongeladas y se realizando la extracción del RNA por método del Trizol con el reactivo *TRIZOL Reagent* de (Ambion life technologies, Austin, Texas, E.E. U.U. A. A.). Se agregaron 700 μL de Trizol al pellet celular. Se hizo un paso de lisis por pipeteo vórtex <1 min hasta eliminar el pellet celular y se incubó por 7 minutos en hielo para permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se adicionó 300 μL de cloroformo para una incubación posterior de 3 minutos. Se centrifugó la muestra a 13 000 rpm por 15 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Se retiró 400 μL de la fase acuosa con RNA y se colocó en un tubo nuevo con 500 μL de isopropanol para incubar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche. Se centrifugó la muestra a 13 000 rpm por 15 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se agregó 500 μL de etanol al 75% para posteriormente centrifugar a 10

000 rpm por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se secó la muestra por 10-15 min a temperatura ambiente. Se resuspendió la muestra en 20 µL de buffer TE 1X y se diluyó en termoblock por 20 min a 55-60 °C. Se tomó 2 µL y, por duplicado, se realizó la cuantificación de la concentración y pureza de RNA extraído por método espectrofotométrico con el equipo Epoch BioTek (Winooski, Vermont, E. E. U. U. A. A.). La técnica se estandarizó para obtener índices de pureza de 1.7-2.0 bajo la relación 260/280 y una concentración >100 ng/ µL. La integridad del RNA extraído se evaluó en el fotodocumentador iBright CL100 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, E.E. U.U. A. A.) con la aparición de las bandas 28s y 18s en un gel de agarosa al 1.5% tras un corrimiento electroforético por 50 min a 80 mV.

6.7.6 RT y qPCR

La retrotranscripción (RT) del RNA se llevó a cabo con el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, E.E. U.U. A. A.). La composición de la mezcla de trabajo por muestra se indica en el anexo 1. Se tomó el equivalente a 1 µg de RNA y se aforó a 10 µL de agua inyectable. Posteriormente, se adicionó 10 µL de la mezcla anteriormente preparada, con lo cual se contó con un volumen final de 20 µL para la reacción de RT. El contenido se colocó en el termociclador Techne TC-312 bajo las condiciones de trabajo indicadas en el anexo 2. Se tomó 2 µL del DNA complementario (cDNA) obtenido y, por duplicado, se realizó la cuantificación de la concentración y pureza por método espectrofotométrico. La técnica se estandarizó para obtener índices de pureza de 1.8-2.0 bajo la relación 260/280 y una concentración >1000 ng/µL. Las muestras de cDNA obtenidas se ajustaron a 200 ng/µL y se usaron para la reacción en cadena de la DNA polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando el fluorocromo SYBR Green del kit comercial *SYBR Select Master Mix 1x5 mL* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, E.E. U.U. A. A.). Los componentes de la mezcla de trabajo por muestra se detallan en el anexo 3. La reacción de qPCR por cada tubo incluyó 2 µL de cDNA (400 ng/µL) y 8 µL de *master mix* para cada gen. Se realizó el duplicado para cada muestra. Adicionalmente, se incluyó un *No Template Control* (NTC) para cada gen, el cual constaba de 2 µL de

agua inyectable y 8 μ L del *master mix*. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, E.E. U.U. A. A.) bajo las condiciones indicadas en el anexo 4. Al finalizar la qPCR se obtuvo los valores de *cycle threshold* (CT) para el cálculo de la expresión relativa, y además la temperatura de fusión (*melting*). Al utilizar un agente fluorescente inespecífico de las secuencias de interés como lo es el SYBR Green, fue necesario estandarizar la técnica para conocer la temperatura a la que se alcanza la fluorescencia máxima e identificar la presencia de un único producto de amplificación para cada gen. En el anexo 5 se indican las temperaturas establecidas para cada uno de los genes en estudio. La secuencia de los cebadores (oligos) (T4 OLIGO, Irapuato, Guanajuato, México) empleados para cada uno de los genes en estudio se indican en el anexo 6.

6.7.7 Expresión relativa de los receptores purinérgicos

El cálculo de la expresión relativa de los genes purinérgicos se realizó con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se calculó el valor promedio de las réplicas del gen constitutivo β -actina y del gen purinérgico de interés, se restaron los valores para obtener el ΔCt . Para cada gen purinérgico se obtuvo un ΔCt promedio utilizando los valores del grupo control. A cada ΔCt , tanto del grupo control como de los pacientes, se le restó el valor de ΔCt promedio del grupo control, obteniendo el $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, el valor de $\Delta\Delta Ct$ fue exponencializado con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Únicamente se trabajó con muestras con valor promedio de CT para el gen endógeno β -actina entre 15 y 22 ciclos.

6.7.8 Marcaje y análisis de receptores purinérgicos en PBMC por citometría de flujo

1×10^6 células/mL descongeladas se incubaron con 2 μ L de anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) y de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.E. U.U. A.A.) dirigidos contra las proteínas de superficie CD3 (cat. # 12-0037-42) y CD39 (cat. # MA1-81312), respectivamente, previo a una centrifugación a 1500 rpm por 5 min. Posterior a una incubación a 4 °C por 20 min, lavado con PBS 1X y fijación con paraformaldehído (PFA) al 4%, las células se permeabilizaron con saponina al 0.1% y se incubaron por 10 min en refrigeración

se agregó 2 μ L del anticuerpo primario anti-P2X₁ (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.E. U.U. A.A.) (cat. # PA5-114312) o anti-P2X₇ (Chemicon International, Inc., Temecula, California, E.E. U.U. A.A.) (cat. # AB5246) para posteriormente dejar por 30 min en refrigeración. Para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos se agregó 100 μ L de albumina bovina sérica (BSA) al 2% y un posterior lavado con PBS 1X. Tras una segunda permeabilización con saponina al 0.1% se agregó 2 μ L de anticuerpo secundario anti-conejo IgG acoplado a Alexa Fluor 647(AF647) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, E.E. U.U. A. A.) (cat. # A-21244) o anti-PA_{2A} acoplado a FITC (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, E.E. U.U. A. A.) (cat. # 7F6-G5-A2) para ser incubados a 4 °C por 30 minutos. Finalmente, las células se fijaron con 200 μ L de PFA al 1% y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis por citometría de flujo.

6.7.9 Estrategia de lectura por citometría de flujo

Se utilizó el equipo BD Facs Canto II con el software FlowJo v.10.8.1 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, E.E. U.U. A. A.). Los paneles analizados incluyeron CD3 P2X₁ CD39, CD3 P2X₇ CD39 y CD3 P2X₇ PA_{2A}. Por cada muestra se disponía de la condición células sin adicionar ningún anticuerpo y células en presencia de un anticuerpo control llamado control de isotipo. Para el análisis durante la adquisición se delimitó a los eventos únicos (*singlets*) en el *dotplot* FSC-H vs FSC-A a un voltaje de 350 mv. Posteriormente, se identificó la población correspondiente a los linfocitos y monocitos. En el caso de la población linfocitaria se determinó a aquellos linfocitos CD3⁺ de los linfocitos CD3⁻ a través del *dotplot* FSC-A vs PE-A. En ambas poblaciones, CD3⁺ y CD3⁻, se prosiguió con la identificación de células dobles y simples positivas para CD39, P2X₁ y o P2X₇. Se analizó datos de porcentaje de positividad y de intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada marcador evaluado. En el anexo 7 se muestra la secuencia de gate utilizada en controles y pacientes.

6.8. Diseño estadístico

Se determinó la normalidad de los datos a través de las pruebas de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorv-Smirnov. Se consideró como datos no

paramétricos si al menos una de las tres prueba indicaba no normalidad. Para identificar la diferencia entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para datos no paramétricos y prueba de Welch para datos paramétricos. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Se realizó un análisis de correlación de datos con la matriz de correlación de Pearson para datos paramétricos y prueba de Spearman para datos no paramétricos. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Los *outliers* se identificaron con el método ROUT y un valor de $Q = 5\%$. Los datos se analizaron en el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, E.E. U.U. A.A.).

6.9 Delimitación y limitaciones

El siguiente trabajo se delimitó al análisis de muestras de sangre completa y suero de controles y pacientes obtenidas durante el periodo de diciembre 2022 a marzo 2023 en los Estados de San Luis Potosí y Zacatecas. Dentro de las limitantes del estudio se encuentra la imposibilidad de utilizar métodos específicos para la cuantificación de citocinas en suero para ambos grupos, un tamaño de muestra baja, reflejado al momento de la estratificación por grupos. Además de la imposibilidad de acceder al expediente clínico completo de los pacientes que permitiese la integración de un mayor número de variantes clínicas dentro del estudio.

7.2. Discusión

La vía purinérgica y su relación con la infección por SARS-CoV-2 ha sido poco estudiada. Los resultados de esta investigación indican que durante COVID-19 existe un aumento en fenotipos purinérgicos de PBMC, principalmente P2X₇, asociados a parámetros antropométricos (IMC y porcentaje de grasa) y un desequilibrio en las concentraciones de colesterol LDL que en conjunto podrían estar ligados a un pronóstico desfavorable en estos pacientes.

Los receptores P2X₁, P2X₄ y P2X₇ participan en la sinapsis inmunológica y activación de linfocitos T con aumento en la entrada de Ca²⁺ y liberación autocrina

de ATP por la traslocación de los canales panexina-1 (Brock, y otros, 2022) (Woehrle, y otros, 2010). P2X₇ participa además en la activación de monocitos humanos (Gudipaty, Humphreys, Buell, & Dubyak, 2001) y liberación de IL-1β (Ward, y otros, 2010). La presentación antigénica y activación linfocitaria se realiza en los órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, donde las células activas muestran un tránsito linfocitario activo. Proponemos que un gran porcentaje de linfocitos T y monocitos en circulación de los pacientes con COVID-19 de fenotipo P2X₁⁺ o P2X₇⁺, podrían encontrarse en un estado activo debido a varios marcadores de activación entre ellos los receptores purinérgicos. Sin embargo, es necesario cuantificar productos relacionados a la actividad de estos receptores y simultáneamente identificar la presencia de marcadores de activación en linfocitos T, como CD25 y CD69 (Shipkova & Wieland, 2012) y la relación de monocitos clásicos/no clásicos que confirmen nuestra propuesta.

Se requiere cuantificar al receptor P2X₄ a nivel de proteína e identificar la subpoblación de PBMC a la que corresponde el aumento de la expresión relativa. Al respecto, se han identificado receptores purinérgicos funcionales de tipo P2X_{4/7} y P2X_{1/4/7} en macrófagos derivados de monocitos humanos (Vargas-Martínez, y otros, 2020) por lo que estos receptores podrían estar regulando funciones fagocíticas y de activación clásica en estos macrófagos alveolares (Stokes & Surprenant, 2009). Durante COVID-19 existe una disminución de monocitos no clásicos (antiinflamatorios), los cuales migran al tejido pulmonar para convertirse en macrófagos tipo 1 o clásicos (inflamatorios) y fungir como células presentadoras de antígenos a linfocitos T (Kapellos, y otros, 2019) (Knoll, Schultze, & Schulte-Schrepping, 2021), donde los fenotipos P2X₁⁺, P2X₄⁺ y P2X₇⁺ podrían estar involucrados en las funciones asociadas a estas células y contribuir al aumento de citocinas proinflamatorias durante la enfermedad.

La posible activación celular mediada por los receptores P2X₁, P2X₄ y P2X₇ en linfocitos T es relevante y podría explicar la disminución de esta subpoblación en circulación encontrada en los pacientes con COVID-19, ya que bajo esta condición se promueve su quimioatracción, principalmente de linfocitos T CD8⁺, de la sangre

hacia el tejido pulmonar (Jiang, y otros, 2020) (Weiskopf, y otros, 2020). Se ha reportado un aumento en las concentraciones séricas de ATP derivado de una menor actividad hidrolítica de esta molécula en PBMC de pacientes con COVID-19 (da Silva, y otros, 2022). El probable aumento de ATP extracelular en nuestro grupo COVID-19 podría explicar la disminución encontrada de la MFI de P2X₁ en linfocitos T, además de los niveles de expresión relativa de genes similares respecto al grupo control, puesto que P2X₁ se encontraría en un proceso de internalización debido a su rápida desensibilización dando lugar a una mayor expresión de P2X₇, el cual requiere de una mayor cantidad de ATP para lograr ser activado (Burnstock, 2018) (De Salis, y otros, 2022). Sin embargo, se requieren estudios que permitan confirmar el aumento de ATP en suero en COVID-19, además de identificar el efecto de las concentraciones de ATP en la cinética de intercambio de P2X₁ y P2X₇ a nivel de membrana en linfocitos T durante la enfermedad.

Nuestros datos confirman el incremento en la expresión relativa de P2X₇ (Schultz, Bertoni, & Wink, 2022), donde hemos encontrado un predominio de la isoforma P2X_{7B} durante COVID-19. Lo anterior, podría relacionarse con una mayor supervivencia y proliferación de las PBMC en presencia de la enfermedad, ya que la activación de P2X₇ induce una mayor secreción de IL-2 en linfocitos T (Yip, y otros, 2009), mismo que permite una mayor proliferación de estas células. La menor expresión de la isoforma P2X_{7A} durante COVID-19, indicaría que la formación del macroporo en la membrana celular asociado a la forma completa de esta proteína (De Salis, y otros, 2022) se encontraría limitada. Sin embargo, una de las principales limitantes es la falta de anticuerpos específicos para cada una de las isoformas que permita identificar la conformación homo o heterotrimérica del receptor P2X₇.

En el aumento de linfocitos CD3⁻ con fenotipo P2X₁⁺ o P2X₇⁺ encontrado en COVID-19, es importante destacar que tanto linfocitos B (CD3⁻ CD19⁺) como linfocitos *natural killer* (NK) (CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺) son las principales subpoblaciones de esta estirpe que se encuentran en circulación. Durante COVID-19 los linfocitos B y NK se encuentran disminuidos en circulación (Xu, y otros, 2020) y que además juegan un papel importante en la respuesta inmune frente al virus (Delshad, y otros, 2021)

y, si bien se ha descrito la presencia de P2X₁, P2X₄ y P2X₇ en linfocitos B (Sluyter, Barden, & Wiley, 2001), poco se sabe de las funciones que podrían estar ejerciendo en estas células. Se ha identificado que P2X₁ regula la secreción de IL-22, una citocina con propiedades pro y antiinflamatorias, por linfocitos NK infiltrantes en tejido hepático y que permite la regeneración tisular (Kudira, y otros, 2016). La activación de P2X₇ puede dar lugar al desprendimiento de CD23 en linfocitos B humanos donde regula la captura y presentación antigénica (Pupovac, Geraghty, Watson, & Sluyter, 2015), mientras que en linfocitos NK induce una menor actividad citotóxica en el microambiente tumoral (Baroja-Mazo, y otros, 2023). Se ha reportado que los linfocitos NK tienen una mayor MFI para P2X₇ en comparación con linfocitos B y Tγδ (Winzer, y otros, 2022). Nuestros datos destacan la importancia de identificar si el aumento de P2X₁, P2X₄ y P2X₇ se presenta en linfocitos B, linfocitos NK o en ambos, durante COVID-19 y si estos fenotipos pudiesen condicionar la progresión de la enfermedad, modificando las funciones de estas células.

Respecto al receptor PA_{2A}, se sabe que en linfocitos T, junto a CD39, es esencial para la conversión hacia linfocitos T reguladores (Treg)(antiinflamatorios) sobre linfocitos Th17 (proinflamatorios) (Zarek, y otros, 2008) (Wang, y otros, 2021). El aumento de la expresión relativa de PA_{2A} que se encontró en COVID-19 difiere a lo reportado por otros autores, los cuales indican una disminución de este gen en COVID-19 grave (Pietrobon, y otros, 2022). Nosotros consideramos que esta diferencia es debido a la estratificación realizada por los autores, ya que al considerar únicamente la presencia de COVID-19, este gen se vería aumentado en comparación de la ausencia de la enfermedad. El aumento de la expresión relativa de PA_{2A} encontrada en nuestro estudio podría atribuirse a un mecanismo compensatorio por la elevación de los genes P2X₁, P2X₄ y las isoformas de P2X₇, no obstante, se dispone de poca o nula información que nos permita confirmar o descartar esta teoría. Además, la unión de adenosina a PA_{2A} es capaz de atenuar la actividad inflamatoria inducida por la activación de TLR4 en monocitos humanos estimulados con lipopolisacárido a través de la inhibición de factores de transcripción para IL-23 (Crean, y otros, 2015). Por lo tanto, no se puede descartar

la propuesta de que este, u otro mecanismo, pueda modificar factores de transcripción relacionados con la actividad de los receptores P2X, siendo que tanto los receptores TLR como los P2X son parte de la respuesta inmune innata activados por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como lo es el ATP.

Estudios en cerebro y células de feocromocitoma de ratas el gen *Adora2a* codifica tanto PA_{2A} como a la proteína uORF5 la cual utiliza un marco de lectura diferente a PA_{2A} y que en condiciones de hipoxia ambas proteínas se encuentran aumentadas. uORF5 podría funcionar como un regulador transcripcional en respuesta a la estimulación de PA_{2A} (Lee, Lai, Lee, Chien, & Chern, 2013). Esta información podría explicar nuestro hallazgo respecto a la disminución de linfocitos T PA_{2A}⁺ y linfocitos CD3⁻ PA_{2A}⁺ a pesar de haber encontrado un aumento de la expresión relativa para PA_{2A} en COVID-19, por lo cual es importante identificar la posible existencia de mecanismos postranscripcionales en PBMC, como lo puede ser uORF5, que limiten la expresión de la proteína en estas subpoblaciones celulares, promoviendo funciones proinflamatorias durante COVID-19.

Datos en la literatura indican que >90% de linfocitos B y monocitos son positivos para CD39, mientras que solo existe un 10% de positividad en linfocitos T, siendo mayor en linfocitos T CD4⁺ (20-30%) que en linfocitos T CD8⁺ (<5%) (Zhao, Bo, Kang, & Li, 2017). En la subpoblación de linfocitos Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) se ha descrito que la presencia de CD39 contribuye a su actividad supresora a nivel periférico (Bynoe & Viret, 2008) y que la expresión de CD39 es proporcional a los niveles de Foxp3 (Borsellino, y otros, 2007). En COVID-19 existen cambios en el porcentaje de linfocitos Treg en circulación (Chen, y otros, 2020) (Qin, y otros, 2020). Nuestros datos confirman el aumento de la MFI de CD39 en linfocitos T durante COVID19, además de la ausencia de cambios en el porcentaje de linfocitos T CD39⁺, reportado por otros autores (Díaz-García, y otros, 2022) (Ahmadi, y otros, 2020). La información obtenida en este estudio destaca la importancia de identificar la presencia y actividad de los linfocitos T CD39⁺ y si en estas células se estaría promoviendo una respuesta reguladora que límite la función proinflamatoria de los receptores P2X durante COVID-19.

Cabe aclarar que respecto a los fenotipos dobles $P2X_1^+ CD39^+$, $P2X_7^+ CD39^+$ y $P2X_7^+ PA_{2A}^+$, este estudio es el primero en identificar el porcentaje de linfocitos T ($CD3^+$), $CD3^-$ y monocitos con estos fenotipos en sujetos control y en COVID-19, por ende, la información con la cual contrastar nuestros datos con lo reportado en la literatura se encuentra limitada. El aumento de los linfocitos T con fenotipo $P2X_7^+ CD39^+$ y $P2X_7^+ PA_{2A}^+$ en pacientes con COVID-19, podrían promover la degradación de ATP extracelular hasta adenosina y la posterior activación de PA_{2A} , con la finalidad de posiblemente limitar la función de $P2X_7$ en linfocitos T. No obstante, es necesario confirmar o descartar esta teoría con la identificación en la expresión de CD73, responsable directo de la formación de adenosina y que en sujetos sanos presenta una mayor frecuencia respecto a CD39 en linfocitos totales y linfocitos T $CD4^+$ (Guzman-Flores, y otros, 2015), además de productos que indiquen el grado de actividad de $P2X_7$ y PA_{2A} en estas células durante la enfermedad. Aunado a esto, nuestra propuesta es que durante COVID-19 existe un predominio de $P2X_7$ (medido como MFI) sobre PA_{2A} en esta población celular, por lo cual es necesario la medición de la actividad de los receptores en linfocitos T, por ejemplo, la activación de PA_{2A} e identificar una menor producción de lactato deshidrogenasa y un mayor efecto protector frente a la apoptosis por inhibición del factor de transcripción NF- κ B en la línea celular de linfocitos T Jurkat (Himer, y otros, 2010). Por otro lado, la activación de $P2X_7$ da lugar al ensamblaje del inflamosoma por la vía NLRP3, con la subsecuente liberación de las citocinas proinflamatorias IL- 1β e IL-18 (Wiley, Sluyter, Gu, Stokes, & Fuller, 2011) y la liberación de CD62L, generando CD62L en su forma soluble (CD62Ls), puede ser empleado como marcador indirecto de la actividad de $P2X_7$ en linfocitos T (Cortés-García, y otros, 2016). Con esta información, nosotros esperaríamos que los linfocitos T del grupo COVID-19 presenten una mayor concentración de IL- 1β e IL-18, además de un aumento sérico de estas citocinas junto a CD62Ls, y confirmar lo reportado por otros autores respecto a que este aumento conduce a complicaciones clínicas durante la enfermedad.

Considerando el posible predominio de las funciones relacionadas con $P2X_7$ en COVID-19, es relevante la relación encontrada de los fenotipos positivos para este

marcador y su relación con el IMC y el porcentaje de grasa, donde valores altos en ambos parámetros se relacionarían con una mayor cantidad de tejido adiposo, donde la función purinérgica es relevante. Se sabe que PA_{2A} es abundante en el tejido adiposo pardo de mamíferos, donde su activación induce la lipólisis por aumento del coactivador del receptor proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) y termogénesis por estimulación de la proteína desacoplante 1 (UCP1) en mitocondria (Rines, Verdeguer, & Puigserver, 2015) (Meriño, Briones, Palma, Herlitz, & Escudero, 2017), previniendo obesidad en un modelo murino (Gnad, y otros, 2014). Por el contrario, P2X₇ es un regulador negativo de la lipólisis (Li, Gong, & Xu, 2022), potencializa la acumulación de lípidos en adipocitos de ratón por supresión de los genes sirtuin-3 y 5 (Chiang, Cheng, Lien, Huang, & Lin, 2022) y aumenta la expresión de IL-6 y TNF- α en tejido adiposo blanco humano, además de un mayor número de linfocitos Th17 residentes en este tejido (Pandolfi, y otros, 2016) (Madec, y otros, 2011) (Yang, Story, Hao, Sumpter, & Mathers, 2022).

En tejido adiposo de sujetos con sobrepeso y obesidad existe una mayor condición de estrés, principalmente por hipoxia, lo cual puede conducir a la muerte por piroptosis de los adipocitos (Giordano, y otros, 2013), mismos que se encuentran rodeados por linfocitos T y macrófagos infiltrados que adquieren un perfil proinflamatorio (Strissel, y otros, 2007) (DeFuria, y otros, 2013). Estudios en nuestro grupo de investigación reportó valores similares de linfocitos T CD4⁺ P2X₁⁺ y P2X₇⁺ tanto en circulación como en tejido adiposo (Ruíz-Rodríguez, y otros, 2019). Se ha reportado que en pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo II hay una disminución en la expresión a nivel de mRNA de PA_{2A} y PA₃ en PBMC (Fakhoury, y otros, 2022) y que en estas mismas enfermedades el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ presentan mayores niveles de CD73 y menor CD39 (Guzman-Flores, y otros, 2015). Ahora proponemos, que la condición hipóxica en tejido adiposo de sujetos con sobrepeso u obesidad, medido tanto con el IMC como con el porcentaje de grasa, conduce a una mayor liberación de ATP, generando un aumento del infiltrado linfocitario con fenotipo proinflamatorio (P2X₇⁺ o PA_{2A}⁻), los cuales podrían llegar hasta ganglios linfáticos (von der Weid & Rainey, 2010) o bien regresar a circulación, y que durante COVID-19 las PBMC condicionadas a este perfil proinflamatorio,

podrían relacionarse a complicaciones clínicas por una mayor producción de citocinas con actividad inflamatoria.

Se ha reportado un aumento de IL-1, IL-18 y PCR en suero, además de una correlación positiva en las concentraciones de P2X₇ soluble en plasma de pacientes con COVID-19 severo (García-Villalba, y otros, 2022). Otros autores reafirman la relación positiva en las concentraciones de PCR y P2X₇ soluble en suero en COVID-19 (Giuliani, y otros, 2019). Si bien nuestros datos sobre el aumento de PBMC con fenotipo P2X₇⁺ en COVID-19 podrían corroborar esta información, consideramos la utilidad de cuantificar la forma soluble de P2X₇, la cual se relacionaría con una mayor actividad del receptor, e identificar si ambas formas se encuentran aumentadas durante la enfermedad. El aumento de la PCR ha sido planteado como un mecanismo atenuador de la activación de P2X₇ y aumento de IL-1 β (Richter, y otros, 2018) (Giuliani, y otros, 2019), por lo cual nosotros consideramos útil la medición de PCR como un indicador indirecto de la actividad de P2X₇ durante COVID-19. Especulamos que los linfocitos T P2X₇⁺ y linfocitos CD3⁻ P2X₇⁺ podrían estar participando de manera directa con una mayor síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias, lo cual daría lugar al aumento en la producción de PCR hepática y condicionando el pronóstico clínico de la enfermedad.

Adicionalmente, la disminución de colesterol LDL encontrada en COVID-19 confirma lo reportado por otros autores (Fabre, y otros, 2022) (Chidambaram, y otros, 2022), donde esta reducción lipídica en suero podría deberse a la internalización de partículas grasas descritas en monocitos infectados por el SARS-CoV-2, las cuales pueden ser utilizadas como una plataforma de formación de nuevas partículas (Dias, y otros, 2020), a una menor actividad de la lipoproteína lipasa o por la producción de radicales libres, los cuales pueden degradar el colesterol LDL (Wei, y otros, 2020) (Osuna-Ramos, y otros, 2020). Estudios indican que durante COVID-19 existe una correlación negativa entre las concentraciones de colesterol LDL y PCR (Osuna-Ramos, y otros, 2020), nuestros datos muestran esta correlación negativa en COVID-19, pero es necesario incrementar la n de los grupos de estudio que permitan confirmar esta afirmación.

La presencia de enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, dislipidemias y sobrepeso/obesidad se relacionan con un peor pronóstico en COVID-19 (Stefan, Birkenfeld, Schulze, & Ludwig, 2020). Frente al panorama actual nacional e internacional, donde el sobrepeso y la obesidad representan un problema de salud pública que se presenta en un mayor porcentaje de la población año con año (ENSANUT, 2018) (Barquera & Rivera, 2020) (WHO, World Health Organization, 2020). Los resultados de esta investigación reafirman la importancia de considerar las modificaciones de la respuesta inmune en alteraciones metabólicas y la presencia de procesos inflamatorios crónicos de bajo grado, como la acumulación excesiva de grasa corporal y que podría conducir a complicaciones clínicas en enfermedades transmisibles, como lo es COVID-19. Además, destacamos que la modulación del perfil purinérgico, principalmente $P2X_7^+$, podría ser empleada como una potencial diana terapéutica en procesos infecciosos y no infecciosos para disminuir los grados de inflamación aguda y crónica.

7.3. Conclusiones

Durante COVID-19 existe un aumento en la expresión relativa de los genes purinérgicos $P2X_4$, $P2X_{7A}$, $P2X_{7B}$ y PA_{2A} en PBMC, con un predominio de la isoforma $P2X_{7B}$ sobre $P2X_{7A}$.

Existe un aumento de linfocitos T y linfocitos $CD3^-$ con perfil $P2X_1^+$, $P2X_7^+$, $P2X_7^+ CD39^+$ y $P2X_7^+ PA_{2A}^+$ durante COVID-19, mientras que las PBMC PA_{2A}^+ se encuentran disminuidas. No se encontraron cambios en el porcentaje de células únicamente positivas para $CD39^+$ en la enfermedad.

En linfocitos T con fenotipo doble ($P2X_7^+ CD39^+$ y $P2X_7^+ PA_{2A}^+$) existe un predominio de $P2X_7$ (medido como MFI) sobre $CD39$ y PA_{2A} durante COVID-19.

Los fenotipos $P2X_7^+$ se relacionan con un mayor IMC, mayor porcentaje de grasa y elevación de colesterol LDL durante COVID-19.

Los linfocitos $P2X_7^+$ se encuentran aumentados en pacientes COVID-19 con concentraciones de PCR elevadas.

Los linfocitos PA_{2A}^+ se encuentran disminuidos en pacientes con IMC, porcentaje de grasa y PCR elevados.

Se propone identificar los fenotipos $P2X_7^+$, $CD39^+$ y PA_{2A}^+ en linfocitos Treg, Th17, B y NK durante COVID-19. Aunado a la cuantificación de citocinas en suero y la medición de la actividad de los receptores en ambos grupos. Además de reafirmar la importancia de conocer el perfil purinérgico en otras patologías transmisibles y no transmisibles.

VIII. Bibliografía

- Ahmadi, P., Hartjen, P., Kohsar, M., Kummer, S., Schmiedel, S., Bockmann, J. H., . . . Schulze Zur Wiesch, J. (2020). Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73- Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. *Cells*, 9(8). doi: <https://doi.org/10.3390/cells9081750>
- Alabd, S. F., & Yameny, A. A. (2021). C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in COVID-19 mild infection Patients. *Journal of Medical and Life Science*, 3(2), 38-43. doi:<https://doi.org/10.21608/JMALS.2021.240126>
- Alcedo, K. P., Bowser, J. L., & Snider, N. T. (2021). The elegant complexity of mammalian ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Trends in Cell Biology*, 31(10), 829-842. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.05.008>
- Alipoor, S. D., Mortaz, E. J., Jamaati, H., Tabarsi, P., Bayram, H., Varahram, M., & Adcock, I. M. (2021). COVID-19: molecular and cellular response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.563085>
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121-144. doi:<https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Arnaud-Sampaio, V., Bento, C., Glaser, T., Adinolfi, E., Ulrich, H., & Lameu, C. (2022). P2X7 receptor isoform B is a key drug resistance mediator for neuroblastoma. *Frontiers in Oncology*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.966404>
- Baroja-Mazo, A., Peñín-Franch, A., Lucas-Ruiz, F., de Torre-Minguela, C., Alarcón-Vila, C., Hernández-Caselles, T., & Pelegrín, P. (2023). P2X7 receptor activation impairs antitumour activity of natural killer cells. *British journal of pharmacology*, 180(1), 111-128. doi:<https://doi.org/10.1111/bph.15951>
- Barquera, S., & Rivera, J. A. (2020). Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The lancet*.

Diabetes & endocrinology, 8(9), 746-747. doi:[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30269-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30269-2)

Bayot, M. L., Brannan, G. D., & Naidoo, P. (19 de Diciembre de 2022). *Clinical Laboratory*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535358/>

Bennetts, F. M., Mobbs, J. I., Ventura, S., & Thal, D. M. (2022). The P2X1 receptors as a therapeutic target. *Purinergic signalling*, 18(4), 421-433. doi:<https://doi.org/10.1007/s11302-022-09880-4>

Bono, M. R., Fernández, D., Flores-Santibañez, F. F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*, 589(22), 3454-3460. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., . . . Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225-1232. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>

Britannica, T. (18 de Agosto de 2023). *adenosine triphosphate*. Obtenido de <https://www.britannica.com/science/adenosine-triphosphate>.

Brock, V. J., Wolf, I. M., Er-Lukowiak, M., Lory, N., Stähler, T., Woelk, L. M., . . . Diercks, B. P. (2022). P2X4 and P2X7 are essential players in basal T cell activity and Ca²⁺ signaling milliseconds after T cell activation. *Science advances*, 8(5). doi:<https://doi.org/10.1126/sciadv.abl9770>

Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and neuroscience advances*. doi:<https://doi.org/10.1177/2398212818817494>

Bynoe, M. S., & Viret, C. (2008). Foxp3+ CD4+ T cell-mediated immunosuppression involves extracellular nucleotide catabolism. *Trends in Immunology*, 29(3), 99-102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2007.12.005>

Cambridge Dictionary. (2023). *Meaning of... in English*. Obtenido de <https://dictionary.cambridge.org/us/dictionary/english/evaluation>

- Castro-Porras, L., Rojas-Russell, M. E., Villanueva-Sánchez, J., & López-Cervantes, M. (2019). An anthropometry-based equation of fat mass percentage as a valid discriminator of obesity. *Public health nutrition*, 22(7), 1250-1258. doi:<https://doi.org/10.1017/S1368980018004044>
- Cekic, C., & Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 16(3), 177-192. doi:<https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., . . . Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of clinical investigation*, 130(5), 2620-2629. doi:<https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Chiang, C. H., Cheng, C. Y., Lien, Y. T., Huang, K. C., & Lin, W. W. (2022). P2X7 Activation Enhances Lipid Accumulation During Adipocytes Differentiation Through Suppressing the Expression of Sirtuin-3, Sirtuin-5, and Browning Genes. *Frontiers in pharmacology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.852858>
- Chidambaram, V., Kumar, A., Majella, M. G., Seth, B., Sivakumar, R. K., Voruganti, D., . . . Mehta, J. L. (2022). HDL cholesterol levels and susceptibility to COVID-19. *EBioMedicine*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104166>
- Collins English Dictionary, H. P. (26 de Junio de 2023). *Collins English Dictionary*. Obtenido de <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/ectoenzyme>
- Cortés-García, J. D., López-López, C., Cortez-Espinosa, N., García-Hernández, M. H., Guzmán-Flores, J. M., Layseca-Espinosa, E., . . . Portales-Pérez, D. P. (2016). Evaluation of the expression and function of the P2X7 receptor and ART1 in human regulatory T-cell subsets. *Immunobiology*, 221(1), 84-93. doi:<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.018>
- Crean, D., Cummins, E. P., Bahar, B., Mohan, H., McMorrow, J. P., & Murphy, E. P. (2015). Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate

Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. *Journal of immunology*, 195(4), 1436-1448. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402039>

da Silva, G. B., Manica, D., da Silva, A. P., Kosvoski, G. C., Hanauer, M., Assmann, C. E., . . . Bagatini, M. D. (2022). High levels of extracellular ATP lead to different inflammatory responses in COVID-19 patients according to the severity. *Journal of Molecular Medicine*, 100(4), 645-663. doi:<https://doi.org/10.1007/s00109-022-02185-4>

De Salis, S. K., 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). doi:<https://doi.org/10.3390/ijms23158174>

DeFuria, J., Belkina, A. C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J. D., Nersesova, Y. R., . . . Nikolajczyk, B. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 5133-5138. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1215840110>

Delshad, M., Tavakolinia, N., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Safaroghli-Azar, A., Bagheri, N., & Bashash, D. (2021). The contributory role of lymphocyte subsets, pathophysiology of lymphopenia and its implication as prognostic and therapeutic opportunity in COVID-19. *International immunopharmacology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107586>

Dias, S. S., Soares, V. C., Ferreira, A. C., Sacramento, C. Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J. R., . . . Bozza, P. (2020). Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS pathogens*, 16(12). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009127>

Díaz-García, E., García-Tovar, S., Alfaro, E., Zamarrón, E., Mangas, A., Galera, R., . . . Cubillos-Zapata, C. (2022). Role of CD39 in COVID-19 Severity:

Dysregulation of Purinergic Signaling and Thromboinflammation. *Frontiers in immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.847894>

Dos Anjos, F., B., S. J., Assmann, C. E., Carvalho, F. B., & Bagatini, M. D. (2020). Potential therapeutic role of purinergic receptors in cardiovascular disease mediated by SARS-CoV-2. *Journal of Immunology Research*. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/8632048>

ENSANUT. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*. Ciudad de México. Obtenido de https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Fabre, B., Fernandez Machulsky, N., Olano, C., Jacobsen, D., Gómez, M. E., Perazzi, B., . . . Berg, G. (2022). Remnant cholesterol levels are associated with severity and death in COVID-19 patients. *Scientific reports*, 12(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21177-5>

Fakhoury, H. M., Elahi, M. A., Al Sarheed, S., Al Dubayee, M., Alshahrani, A., Zhra, M., . . . Aljada, A. (2022). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in type 2 Diabetes: An exploratory study. *Medicina*, 58(12). doi:<https://doi.org/10.3390/medicina58121829>

García-Hernández, M. H., Mendez-Frausto, G., Vargas-Morales, J.-M., Juarez-Carrillo, E., Jaime-Sanchez, E., Uresti-Rivera, E. E., . . . Portales-Perez, D. (2021). Differential expression of DNA receptors in the severity of COVID 19. *No publicado*.

Garcia-Villalba, J., Hurtado-Navarro, L., Peñin-Franch, A., Molina-Lopez, C., Martinez-Alarcon, L., Angosto-Bazarra, D., . . . Pelegrin, P. (2022). Soluble P2X7 receptor is elevated in the plasma of COVID-19 patients and correlates with disease severity. *Frontiers in immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894470>

Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., . . . Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells

and die of pyroptosis. *Journal of lipid research*, 54(9), 2423-2436.
doi:<https://doi.org/10.1194/jlr.M038638>

Giuliani, A. L., Berchan, M., Sanz, J. M., Passaro, A., Pizzicotti, S., Vultaggio-Poma, V., . . . Di Virgilio, F. (2019). The P2XY receptor is shed into circulation: correlation with C-reactive protein levels. *Frontiers in Immunology*.
doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00793>

Gnad, T., Scheibler, S., von Kugelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glode, A., . . . Pfeifer, A. (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*, 516(7531), 395-399.
doi:<https://doi.org/10.1038/nature13816>

Gobierno de México. (Febrero de 2022). *Guía clínica para el tratamiento de la COVID-19 en México. Consenso de personas expertas del sector salud*.
Obtenido de <https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2022/02/2022.02.15-GuiaClinicaTxCOVID.pdf>

Gudipaty, L., Humphreys, B. D., Buell, G., & Dubyak, G. R. (2001). Regulation of P2X7 nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(4), C943-C953. doi:<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C943>

Gupta, R. (2022). Could anakinra outmatch dexamethasone/tocilizumab in COVID-19? *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1).
doi:<https://doi.org/10.1186/s42269-022-00781-5>

Guzman-Flores, J. M., Cortez-Espinosa, N., Cortés-Garcia, J. D., Vargas-Morales, J. M., Catao-Caizalez, Y. G., Rodríguez-Rivera, J. G., & Portales-Perez, D. P. (2015). Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, 220(8), 976-984.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.02.007>

Hasan, D., Shono, A., van Kalken, C. K., van der Spek, P. J., Krenning, E. P., & Kotani, T. (2022). A novel definition and treatment of hyperinflammation in

COVID-19 based on purinergic signalling. *Purinergic Signalling*, 18(1), 13-59.
doi:<https://doi.org/10.1007/s11302-021-09814-6>

He, X., Zhang, Y., Xu, Y., Xie, L., Yu, Z., & Zheng, J. (2021). Function of the P2X7 receptor in hematopoiesis and leukemogenesis. *Experimental Hematology*, 104, 40-47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.10.001>

Himer, L., Csóka, B., Selmeczy, Z., Koscsó, B., Pócza, T., Pacher, P., . . . Haskó, G. (2010). Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(8), 2631-2640. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.10-155192>

Huang, P., Zou, Y., Zhong, X. Z., Cao, Q., Zhao, K., Zhu, M. X., . . . Dong, X. P. (2014). P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17658-17667. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552158>

Huang, Y. Z., & Kuan, C. C. (2022). Vaccination to reduce severe COVID-19 and mortality in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 26(5), 1770-1776. doi:https://doi.org/10.26355/eurrev_202203_28248

Huang, Z., Xie, N., Illes, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., . . . Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

Huet, T., Beaussier, H., Voisin, O., Jouveshomme, S., Dauriat, G., Lazareth, I., . . . Hayem, G. (2020). Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *The Lancet*, 2(7), e393–e400. doi:[https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30164-8](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30164-8)

Institute for Health Metrics and Evaluation. (2022). *Informe de resultados de COVID-19*. Obtenido de

https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/Projects/COVID/2022/130_briefing_Mexico_0.pdf

- Jiang, Y., Wei, X., Guan, J., Qin, S., Wang, Z., Lu, H., . . . Lin, X. (2020). COVID-19 pneumonia: CD8+ T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. *Clinical immunology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108516>
- Junqueira, C., Crespo, Â., Ranjbar, S., Lewandrowski, M., Ingber, J., de Lacerda, L. B., . . . Lieberman, J. (2021). SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. *medRxiv*. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-153628/v1>
- Kanellopoulos, J. M., Almeida-da-Silva, C. L., Rützel Boudinot, S., & Ojcius, D. M. (2021). Structural and functional features of the P2X4 receptor: an immunological perspective. *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645834>
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>
- Klop, B., Elte, J. W., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218-1240. doi:<https://doi.org/10.3390/nu5041218>
- Knoll, R., Schultze, J. L., & Schulte-Schrepping, J. (2021). Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.720109>
- Kudira, R., Malinka, T., Kohler, A., Dosch, M., de Agüero, M. G., Melin, N., . . . Beldi, G. (2016). P2X1-regulated IL-22 secretion by innate lymphoid cells is required for efficient liver regeneration. *Hepatology*, 63(6), 2004–2017. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.28492>

- Lee, C. F., Lai, H. L., Lee, Y. C., Chien, C. L., & Chern, Y. (2013). The A2A Adenosine Receptor Is a Dual Coding Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1257-1270. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509059>
- Li, J., Gong, L., & Xu, Q. (2022). Purinergic 2X7 receptor is involved in adipogenesis and lipid degradation. *Experimental and therapeutic medicine*, 23(1). doi:<https://doi.org/10.3892/etm.2021.11004>
- Madec, S., Rossi, C., Chiarugi, M., Santini, E., Salvati, A., Ferrannini, E., & Solini, A. (2011). Adipocyte P2X7 receptors expression: a role in modulating inflammatory response in subjects with metabolic syndrome? *Atherosclerosis*, 219(2), 552-558. doi:<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.012>
- Meriño, M., Briones, L., Palma, V., Herlitz, K., & Escudero, C. (2017). Role of adenosine receptors in the adipocyte-macrophage interaction during obesity. *Endocrinología, diabetes y nutrición*, 64(6), 317-327. doi:<https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.03.010>
- Montejano-Medina, L., Martel-Gallegos, M., Zarazúa-Guzmán, S., Reynaga-Hernández, E., & Rodríguez-Menchaca, A. (2020). Papel de los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2 en el procesamiento de APP en neuronas en cultivo expuestas a arsénico [Tesis de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí].
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2023). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Protein+Isoforms%22%5BMeSH+Terms%5D>
- NIH. National Cancer Institute. (2023). *Instituto Nacional del Cáncer*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metabolico>

- NIH. National Cancer Institute. (2023). *NCI Dictionary of Cancer Terms*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/sars-cov-2>
- Osuna-Ramos, J., Rendón-Aguilar, H., Jesús-González, L., Reyes-Ruiz, J., Espinoza-Ortega, A., & Ochoa-Ramírez, L. (2020). Serum lipid profile changes and their clinical diagnostic significance in COVID-19 Mexican Patients. *medRxiv*. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.08.24.20169789>
- Pandolfi, J. B., Ferraro, A. A., Sananez, I., Gancedo, M. C., Baz, P., Billordo, L. A., . . . Arruvito, L. (2016). ATP-induced inflammation drives tissue-resident Th17 cells in metabolically unhealthy obesity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *196*(8), 3287-3296. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502506>
- Paolini, A., Borella, R., De Biasi, S., Neroni, A., Mattioli, M., Lo Tartaro, D., & ... & Gibellini, L. (2021). Cell death in coronavirus infections: Uncovering its role during COVID-19. *Cells*, *10*(17). doi:<https://doi.org/10.3390/cells10071585>
- Pegoraro, A., Orioli, E., De Marchi, E., Salvestrini, V., Milani, A., Di Virgilio, F., . . . Adinolfi, E. (2020). Differential sensitivity of acute myeloid leukemia cells to daunorubicin depends on P2X7A versus P2X7B receptor expression. *Cell death & disease*, *11*(10), 1-12. doi:<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03058-9>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2022). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acid research*, *30*(9), e36-e36. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pietrobon, A. J., Andrejew, R., Custódio, R. W., Oliveira, L. M., Scholl, J. N., Teixeira, F. M., . . . Sato, M. (2022). Dysfunctional purinergic signaling correlates with disease severity in COVID-19 patients. *Frontiers in immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012027>

- Pupovac, A., Geraghty, N. J., Watson, D., & Sluyter, R. (2015). Activation of the P2X7 receptor induces the rapid shedding of CD23 from human and murine B cells. *Immunology and cell biology*, 93(1), 77-85. doi:<https://doi.org/10.1038/icb.2014.69>
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., . . . Tian, D. S. (2020). Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 762-768. doi:<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
- Ribeiro, D. E., Oliveira-Giacomelli, Á., Glaser, T., Arnaud-Sampaio, V. F., Andrejew, R., Dieckmann, L., . . . Ulrich, H. (2021). Hyperactivation of P2X7 receptors as a culprit of COVID-19 neuropathology. *Molecular psychiatry*, 26(4), 1044-1059. doi:<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00965-3>
- Richter, K., Sagawe, S., Hecker, A., Küllmar, M., Askevold, I., Damm, J. H., . . . Grau, V. (2018). C-Reactive Protein Stimulates Nicotinic Acetylcholine Receptors to Control ATP-Mediated Monocytic Inflammasome Activation. *Frontiers in immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01604>
- Rines, A., Verdeguer, F., & Puigserver, P. (2015). Adenosine activates thermogenic adipocytes. *Cell Reseach*, 25(2), 155-156. doi:<https://doi.org/10.1038/cr.2014.157>
- Ruan, Z., Orozco, I., & Du, J. (2020). Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*, 584(7822), 646-651. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2357-y>
- Ruíz-Rodríguez, V. M., Cortes-García, J. D., Briones-Espinoza, M. J., Rodríguez-Varela, E., Vega-Cárdenas, M., Gómez-Otero, A., . . . Portales-Pérez, D. (2019). P2X4 receptor as a modulator in the function of P2X receptor in CD4+ T cells from peripheral blood and adipose tissue. *Molecular Immunology*, 112, 369-377. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.06.009>

- Sadeghi-Haddad-Zavareh, M. B. (2021). C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in COVID-19 Patients. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. doi:<https://doi.org/10.1155/2021/5557582>
- Sahu, A., Mathew, R., Aggarwal, P., Nayer, J., Bhoi, S., Satapathy, S., & Ekka, M. (2021). Clinical determinants of severe COVID-19 disease-A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 13(1), 13. doi:https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_136_20
- Saltzman, E., & Mogensen, K. M. (2013). Physical and Clinical Assessment of Nutrition Status. En A. Coulston, C. Boushey, & M. Fer, *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (págs. 65-79).
- Sarikaya, E. (2020). Functions of Purinergic Receptors. En R. Faria, *Receptors P1 and P2 as Targets for Drugs Therapy in Humans*. IntechOpen. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.78115>
- Schultz, I. C., Bertoni, A. P., & Wink, M. R. (2022). Purinergic signaling elements are correlated with coagulation players in peripheral blood and leukocyte samples from COVID-19 patients. *Journal of Molecular Medicine*, 100(4), 569-584. doi:<https://doi.org/10.1007/s00109-021-02175-y>
- Secretaría de Salud, S. d. (2022). *Informe integral de COVID-19 en México*. Obtenido de https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2022/01/Informe-Integral_COVID-19_12ene22.pdf
- Secretaria de Salud, S. d. (2023). *Informe técnico semanal COVID-19 México*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/documentos/coronavirus-covid19-informe-tecnico-semanal>
- Shaheen, A., Javed, N., Azam, F., Liaquat, A., Khan, M., & Alam, S. M. (2019). Comparison of Bioelectrical Impedance and Navy Seal Formula to Measure Body Composition in Medical Students. *Cureus*, 11(5), e4723. doi:<https://doi.org/10.7759/cureus.4723>
- Shipkova, M., & Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of*

clinical chemistry, 413(17-18), 1338-1349.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006>

Simões, J. L., Basso, H. F., Kosvoski, G. C., Gavioli, J., Marafon, F., Assmann, C. E., . . . Bagatini, M. D. (2021). Targeting purinergic receptors to suppress the cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection in pulmonary tissue. *Immunopharmacology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108150>

Sluyter, R., & Wiley, J. S. (2014). P2X7 receptor activation induces CD62L shedding from human CD4+ and CD8+ T cells. *Inflammation and Cell Signaling*, 1(3), 44-49. doi:<https://doi.org/10.14800/ics.92>

Sluyter, R., Barden, J. A., & Wiley, J. S. (2001). Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell and tissue research*, 304(2), 231-236. doi:<https://doi.org/10.1007/s004410100372>

Sriram, K., & Insel, P. A. (2021). Inflammation and thrombosis in COVID-19 pathophysiology: Proteinase-activated and purinergic receptors as drivers and candidate therapeutic targets. *Physiological Reviews*, 101(2), 545-567. doi:<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2020>

Stefan, N., Birkenfeld, A. L., Schulze, M. B., & Ludwig, D. S. (2020). Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. *Nature reviews. Endocrinology*, 16(7), 341-342. doi:<https://doi.org/10.1038/s41574-020-0364-6>

Stokes, L., & Surprenant, A. (2009). Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *European journal of immunology*, 39(4), 986–995. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.200838818>

Stringer, D., Braude, P., Myint, P. K., Evans, L., Collins, J. T., Verduri, A., . . . Carter, B. (2021). The role of C-reactive protein as a prognostic marker in COVID-19. *International journal of epidemiology*, 50(2), 420-429. doi:<https://doi.org/10.1093/ije/dyab012>

- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., . . . Obin, M. S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, *56*(12), 2910-2918. doi:<https://doi.org/10.2337/db07-0767>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., & ... & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in microbiology*, *24*(6), 490-502. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Vargas-Martínez, E. M., Gómez-Coronado, K. S., Espinosa-Luna, R., Valdez-Morales, E. E., Barrios-García, T., Barajas-Espinosa, A., . . . Guerrero-Alba, R. (2020). Functional expression of P2X1, P2X4 and P2X7 purinergic receptors in human monocyte-derived macrophages. *European journal of pharmacology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173460>
- von der Weid, P. Y., & Rainey, K. J. (2010). Review article: lymphatic system and associated adipose tissue in the development of inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *32*(6), 697-711. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04407.x>
- Wang, H., Wang, Z., Cao, W., Wu, Q., Yuan, Y., & Zhang, X. (2021). Regulatory T cells in COVID-19. *Aging and disease*, *12*(7), 1545-1553. doi:<https://doi.org/10.14336/AD.2021.0709>
- Ward, J. R., West, P. W., Ariaans, M. P., Parker, L. C., Francis, S. E., Crossman, D. C., & Wilson, H. L. (2010). Temporal interleukin-1 β secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(30), 23147-23158. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072793>
- Wei, X., Zeng, W., Su, J., Wan, H., Yu, X., Cao, X., . . . Wang, H. (2020). Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *Journal of clinical lipidology*, *14*(3), 297-304. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.04.008>

- Weir, C., & Jan, A. (2022). BMI Classification Percentile And Cut Off Points. *StatPearls*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31082114/>
- Weiskopf, D., Schmitz, K. S., Raadsen, M. P., Grifoni, A., Okba, N. M., Endeman, H., & de Vries, R. D. (2020). Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2–specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Science immunology*, *5*(48). doi:<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
- WHO, World Health Organization. (2020). *Observatorio Mundial de la Salud, Obesidad*. Obtenido de <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/ncd-risk-factors>
- WHO. World Health Organization. (2023). *Cronavirus disease (COVID-19)*. Obtenido de https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1
- 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. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01780.x>
- Winzer, R., Serracant-Prat, A., Brock, V. J., Pinto-Espinoza, C., Rissiek, B., Amadi, M., . . . Tolosa, E. (2022). P2X7 is expressed on human innate-like T lymphocytes and mediates susceptibility to ATP-induced cell death. *European journal of immunology*, *52*(11), 1805-1818. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.202249932>
- Woehrle, T. Y., Elkhail, A., Sumi, Y., Chen, Y., Yao, Y., Insel, P. A., & Junger, W. G. (2010). Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood*, *116*(18), 3475-3484. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-277707>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., & ... & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265-269. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

- Xu, B., Fan, C. Y., Wang, A. L., Zou, Y. L., Yu, Y. H., He, C., . . . Miao, Q. (2020). Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. *The Journal of infection*, *81*(1), e51-e60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.012>
- Yang, Y., Story, M. E., Hao, X., Sumpter, T. L., & Mathers, A. R. (2022). P2X7 Receptor Expression and Signaling on Dendritic Cells and CD4+ T Cells is Not Required but Can Enhance Th17 Differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.687659>
- Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., . . . Junger, W. G. (2009). Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1685–1693. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.08-126458>
- Zarei, M., Sahebi Vaighan, N., & Ziai, S. A. (2021). Purinergic receptor ligands: the cytokine storm attenuators, potential therapeutic agents for the treatment of COVID-19. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *43*(6), 633-643. doi:<https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1988102>
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., . . . Powell, J. D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, *111*(1), 251-259. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081646>
- Zhao, H., Bo, C., Kang, Y., & Li, H. (2017). What else can CD39 Tell Us? *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00727>

X. Glosario

Adenosina trifosfato (ATP): nucleótido intracelular. Su hidrolisis da lugar a adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) y adenosina libre. La ruptura en los enlaces de fosfato da lugar a liberación de energía. (Britannica, 2023)

COVID-19: Enfermedad del Coronavirus 2019. Es una infección causada por el virus SARS-CoV-2 (WHO. World Health Organization, 2023).

Ectoenzima: También llamada exoenzima. Grupo de enzimas secretadas por las células y que llevan a cabo sus funciones en el espacio extracelular (Collins English Dictionary, 2023)

Evaluación: Proceso de juzgar o calcular la calidad, importancia, cantidad o valor de algo (Cambridge Dictionary, 2023)

Expresión relativa: Se basa en el índice de expresión de un gen de interés respecto a un gen de referencia. Es el método más utilizado para identificar los cambios en los niveles de expresión de un gen (Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2022)

Índice de masa corporal (IMC): es el peso de una persona en kilogramos (o libras) dividido por el cuadrado de la altura en metros (o pies). Un IMC elevado puede indicar un alto nivel de grasa corporal (Stringer, y otros, 2021).

Isoforma: Diferentes formas de una proteína que pueden ser producidas por diferentes genes o provenir de un mismo gen con *splicing* alternativo, lo cual modifica la secuencia de aminoácidos que los conforman. Comúnmente las isoformas de las proteínas poseen similitudes funcionales (NCBI. National Center for Biotechnology Information, 2023).

Paciente: Persona que recibe cuidado médico o que este bajo tratamiento (Cambridge Dictionary, 2023).

Parámetros antropométricos: Mediciones utilizadas para describir el cuerpo humano como un todo o subdividir el cuerpo en compartimentos. Pueden brindar información sobre el peso, talla o masa corporal de un individuo (Saltzman & Mogensen, 2013).

Parámetros clínicos de laboratorio: Datos derivados del análisis de muestras biológicas (sangre, suero, plasma u orina) que ayudan en el diagnóstico, tratamiento y manejo de pacientes o bien en la identificación de la condición fisiológica de un sujeto sin enfermedad (Bayot, Brannan, & Naidoo, 2022).

Parámetros metabólicos: Conjunto de cambios químicos que ocurren en una célula u organismo para producir energía y materiales básicos para llevar a cabo procesos vitales (NIH. National Cancer Institute, 2023).

Receptores purinérgicos: Familia de moléculas presentes en la membrana celular de diferentes tejidos en mamíferos. Son proteínas de membrana que responden a los nucleótidos extracelulares (ATP, ADP, UTP, UDP o adenosina) (Sarikaya, 2020).

SARS-CoV-2: Agente causal de la enfermedad respiratoria COVID-19 identificado en 2019. Pertenece a la familia de los virus catalogados como coronavirus y que puede infectar a seres humanos y algunos otros mamíferos (NIH. National Cancer Institute, 2023).

Sujetos control: Grupo de personas empleadas para comparar otro grupo en una prueba o experimento. Poseen características similares al grupo de estudio, pero carecen de tratamiento o bien de alguna enfermedad (Cambridge Dictionnary, 2023).