



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DEL
MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS
EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Mayra Dinorah Álvarez Santos

TUTORA

Dra: BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS



MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**DEPARTAMENTO DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL,
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

ASESOR

Dra. BLANCA M. BAZÁN PERKINS

SUSTENTANTE

MAYRA DINORAH ALVAREZ SANTOS

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial
del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosio Villegas” con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología (CONACYT), con número de proyecto III-52356.**

AGRADECIMIENTOS

- ☺ A mi Mamá, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas; por su enseñanza, sabiduría y gran amor.
- ☺ A mis hermanos: Rafael, Cristian y Galadriel, que estuvieron conmigo en todo momento.
- ☺ A mi abuela, Rosa Ma. Rodríguez y a mi Tío Gerardo Santos; que me han tenido paciencia y por su gran cariño.
- ☺ A Alí quien me tendió su mano en cada tropiezo y me ayudó a levantarme. Gracias por darme grandes lecciones de vida. Te amo.
- ☺ A mis grandes amigas: Danae, Tlamahuizolli, Roxana y Lupita por darme sus grandes consejos.
- ☺ A la Dra. Blanca M. Bazán Perkins, por brindarme los conocimientos necesarios para realizar este proyecto, así como su gran su apoyo y paciencia.
- ☺ Al Dr. Ricardo Lascurain por ayudarme en parte de la metodología de este gran proyecto.
- ☺ A la Dra. Patricia Segura, Dr. Ricardo Lascurain, Dra. Blanca Bazán, Biólogo Edgar Sánchez y M. en C. José Luis Arreola por participar en la revisión de mi tesis y por ser jurado de mi examen profesional.
- ☺ Al bioterio “Yolcamecal” por brindarme los cobayos necesarios para los experimentos y por su atención.
- ☺ Finalmente a todos los cobayitos que hicieron posible este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
DEFINICIÓN DE ASMA.....	10
INFLAMACIÓN.....	11
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	11
BRONCOOBSTRUCCIÓN.....	12
EDEMA.....	13
HIPERSECRECIÓN DE MOCO.....	13
MÚSCULO LISO DE LA VÍA AÉREA.....	13
CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN.....	13
BOMBA DE Ca ²⁺ DEL RS.....	14
INTEGRINAS.....	15
SUBUNIDAD β1 DE INTEGRIN.....	16
CAVEOLINA-1.....	16
TGF-β1.....	17
IL-13.....	18
TNF-α.....	18
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIAL Y MÉTODO	21
ANIMALES.....	21
SENSIBILIZACIÓN.....	21
PLETISMOGRAFÍA BAROMÉTRICA.....	21

CONTEO CELULAR TOTAL Y DIFERENCIAL EN LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	24
DISGREGACIÓN CELULAR.....	24
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	25
ESTUDIO EN ÓRGANOS AISLADOS.....	26
6. RESULTADOS.....	27
7. DISCUSIÓN.....	33
8. CONCLUSIÓN.....	37
9. REFERENCIAS.....	38

Resumen

El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por inflamación, hiperreactividad y obstrucción de la vía aérea. Los factores de predisposición al asma son muy heterogéneos, pero el más frecuente es el desarrollo de atopía. Los individuos atópicos usualmente presentan obstrucción de las vías aéreas ante el reto antigénico. No obstante, también hay individuos atópicos que no presentan esta obstrucción. Debido a que la contracción del músculo liso es el principal mecanismo de obstrucción después del reto antigénico, probablemente las características del músculo liso de los individuos respondedores y no respondedores al reto sean diferentes. Para evaluar esta hipótesis se estudiaron las características funcionales y fenotípicas del músculo liso de las vías aéreas de cobayos atópicos que no presentan obstrucción de las vías aéreas después del reto antigénico. Para esto se sensibilizaron al antígeno (ovoalbúmina) cobayos machos Dunkin Hartley de la cepa HsdPoc:DH. Posteriormente fueron retados con el antígeno por una (n=12) o doce (n=12) veces o con solución salina fisiológica durante doce veces (n=7, grupo control). Cada reto se administró a intervalos de diez días, y en cada reto se evaluó el cambio en el índice de broncoobstrucción (íB) mediante pletismografía barométrica. Después del reto antigénico algunos cobayos incrementaron su íB de manera inmediata (1 a 5 min) y transitoria (30 min) (n=16); mientras que en otros el reto antigénico no produjo ningún cambio en el íB (n=8). El día siguiente al último reto antigénico correspondiente, se sacrificaron los cobayos para obtener lavado broncoalveolar (LBA) y la traquea. En el LBA el número de eosinófilos aumentó significativamente desde el primer reto antigénico ($P < 0.05$) en comparación al grupo control. Estudios *in vitro* en órganos aislados mostraron que el músculo liso de los cobayos que no respondieron al reto presentaron una contracción 10 veces menor a la ovoalbúmina que los que respondieron. No obstante, la contracción a la histamina fue similar entre ambos grupos y en los controles. En un estudio previo observamos que el ectodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina en cobayos retados más de nueve veces se comienza a acumular en zonas acelulares de la matriz extracelular. En este estudio se observó que la expresión del dominio citoplasmático y ectodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina en las células disgregadas de músculo liso traqueal de los cobayos mantuvo una correlación altamente significativa ($P < 0.0001$) de 0.846. En el primer reto ambos dominios aumentaron su expresión (~10%) en los cobayos que no respondieron al reto en relación a los cobayos control y a los que responden al reto. En el doceavo reto la expresión de ambas subunidades aumentó (~10%) significativamente ($P < 0.05$) en relación al grupo control. Adicionalmente, la expresión del factor transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) en los miocitos traqueales aumentó (~3%) significativamente ($P < 0.05$) en los cobayos que respondieron al primer reto en relación al grupo control y a los cobayos que no respondieron al reto. Las expresiones de bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA-2), Caveolina 1 (Cav-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 13 (IL-13) no se modificaron de acuerdo al tipo de respuesta al alérgeno ni en relación a los controles. Sin embargo la expresión del endodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina se correlacionó de manera positiva y significativa con la expresión de SERCA-2 ($P < 0.05$), Cav-1 ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.05$) e IL-13 ($P < 0.001$). Concluimos que en este modelo de asma en el cobayo se manifiestan dos fenotipos de músculo liso de las vías aéreas. Cuando el reto antigénico produce broncoobstrucción hay gran expresión de TGF- $\beta 1$, pero si no hay respuesta tras el reto hay una alta expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina. Es probable que la expresión diferencial de integrinas $\beta 1$ y TGF- $\beta 1$ se relacionen con el tipo de respuesta al antígeno. Finalmente, estos datos sugieren que el músculo liso probablemente no es la fuente del ectodominio libre de la subunidad $\beta 1$ de integrina en los cobayos crónicamente retados con el antígeno.

ABREVIATURAS

<u>Abreviaturas</u>	<u>Significado</u>
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Trifosfatasa de adenosina
Ca ²⁺	Ion calcio
Cav-1	Caveolina-1
CEMMs	Microdominios de membrana enriquecidos de colesterol
CD29	Integrina β 1
FEV	Volumen de fuerza espiratoria
GTPasa	Trifosfatasa de guanosina
HVA	Hiperreactividad bronquial
IgE	Inmunoglobulina E
íB	Índice de broncoobstrucción
i.p.	Intraperitoneal
IL-13	Interleucina-13
IP ₃	Trifosfato de inositol
LBA	Lavado broncoalveolar
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
MEC	Matriz extracelular
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
OVA	Ovoalbúmina
RS	Retículo sarcoplásmico
SERCA	ATPasa de calcio de retículo endo-sarcoplásmico
TFG- β	Factor de crecimiento transformante β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VA	Vía aérea

1. Introducción

Durante la respiración celular, las mitocondrias continuamente consumen O_2 y liberan CO_2 para formar energía. En organismos multicelulares como los animales, es fundamental la presencia de un aparato respiratorio que se encargue de suministrar el O_2 ambiental, y en contrasentido, elimine el CO_2 para que se lleve a cabo la respiración celular. La ruta de intercambio gaseoso la conforman las vías aéreas (VA). Estas vías están compuestas de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran en el pulmón (West, 2002). En los mamíferos las VA se dividen en superiores e inferiores. Las superiores están formadas por la nariz, boca, faringe, laringe y tráquea. Las inferiores constan principalmente de bronquios y bronquiolos. Estos últimos terminan en los alvéolos que es el sitio donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso (Ville, 1996).

Las VA son susceptibles a infecciones y enfermedades entre las que se encuentra el asma. El asma es un problema mundial de salud pública debido a que entre el 5 al 10% de la población mundial puede reunir criterios para ser clasificados como asmáticos. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estimó que durante el año 2001 el asma fue responsable de 1 de cada 250 muertes en el mundo (Matthew, 2004).

Nuestro país tiene las tasas más altas de mortalidad por asma en América Latina. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) mostró una tasa de mortalidad de 12.8 por cada 100.000 derechohabientes durante 1990, mientras que la tasa de mortalidad general para 1997 se calculó en 20 por cada 100.000 habitantes.

Recientemente el sistema de Información Médica Oportuna del IMSS reportó que la demanda de consulta para pacientes adultos con diagnóstico de asma en el servicio de Alergia e Inmunología de la Clínica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI fue de 1,904 durante el 2003 y de 2,053 en 2004 (De Marco, 2006).

1.1 Definición de asma

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las VA (The Global Burden of Asthma Report, 2005; Vargas, 2005). El desarrollo del asma puede englobarse en dos eventos patogénicos. El inicio de la enfermedad generalmente es asintomática y ocurre cuando algún factor desencadenante, que suele ser ambiental, afecta la VA de un individuo susceptible hasta desencadenar un proceso inflamatorio. La respuesta celular alterada producida por la inflamación inestabiliza a las VA, haciendo que su calibre se reduzca rápida y fácilmente por estímulos tanto endógenos como exógenos.

A este fenómeno se le conoce como hiperreactividad de la VA (HVA). El segundo suceso patogénico ocurre cuando, una vez instalada la HVA, el sujeto se expone a estímulos que en condiciones normales no ocasionarían cambios en su calibre, como puede ser la inhalación al aire frío, el ejercicio o situaciones de estrés. Estos estímulos ocasionan la disminución del calibre de la VA desencadenando los síntomas típicos del asma (Vargas, 2005).

Los factores que hacen susceptible a un individuo al asma son principalmente genéticos, aunque la obesidad, la edad y el sexo del individuo también pueden estar involucrados. Entre los factores genéticos para la predisposición al asma, la atopía es el más constante. Un individuo atópico es aquel que presenta altos niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica a alergenos que se manifiesta mediante reacciones cutáneas con extractos de alergenos comunes.

Los agentes desencadenantes ejercen una gran influencia sobre los factores de predisposición para la instalación y expresión del asma. El agente desencadenante más conocido es la exposición a alergenos en individuos atópicos, aunque las infecciones virales, el humo de tabaco, la dieta, los sensibilizadores ocupacionales y la contaminación también pueden contribuir a la instalación del asma. La alergia es la consecuencia de la respuesta del sistema inmune ante estímulos externos. Por esto se conoce al asma alérgica también como asma extrínseca. El proceso alérgico se inicia cuando un alergeno es endocitado y procesado por células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas. Los fragmentos degradados del alergeno son presentados a los linfocitos T maduros vírgenes que interactúan con los linfocitos B para producir anticuerpos IgE específicos para el alergeno. Cuando la IgE se une a su receptor de alta afinidad FcεRI que se encuentra en mastocitos y basófilos, el individuo se ha sensibilizado al alergeno. La expresión del asma es un evento posterior que se inicia cuando aparece de nuevo el alergeno y es reconocido por la IgE que se encuentra en la célula sensibilizada (Ying et al, 2006). Estas células liberan diferentes tipos de mediadores algunos de los cuales provocan obstrucción de la vía aérea al inducir contracción del músculo liso. Sin embargo este fenómeno es muy variable pues se ha visto que la exposición al alergeno en individuos atópicos no siempre produce obstrucción de las vías aéreas (Stalenheim et al, 1985; Machado et al, 1986; Smith y Broadley, 2006).

Aunque el asma es referida continuamente como una manifestación de la atopía, a veces el factor desencadenante del asma no está asociado con alergenos. Este tipo de asma no-alérgica, conocida también como intrínseca, aparece generalmente en individuos maduros, principalmente mujeres, y a veces es más severa que el asma extrínseca. Las causas más comunes del asma intrínseca son la

poliposis nasal, la sensibilidad a aspirinas y la dependencia a esteroides. El asma intrínseca es menos frecuente que la extrínseca, y salvo por la presencia de atopia en el asma alérgica, el asma no alérgica es clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similar al asma alérgica (Vargas, 2005).

1.2. Inflamación

Una característica fundamental del asma es la inflamación persistente en las VA. La inflamación se puede definir como una reacción compleja del sistema inmune innato en tejidos vascularizados que produce la acumulación y activación de leucocitos y proteínas plasmáticas y otros mediadores en el sitio de infección o daño. La inflamación inicia cuando se presentan cambios en los vasos sanguíneos que promueven el reclutamiento de leucocitos. Cabe mencionar que el sistema inmune adaptativo local puede promover inflamación como una función protectora para controlar infecciones con el fin de reparar la estructura tisular (Bousquet et al, 2000 y Abbas, 2007). Sin embargo, la persistencia de la inflamación característica del asma imposibilita que se lleven a cabo los procesos de reparación lo que altera la arquitectura de las VA irreversiblemente (Slade y Kraft, 2006). Estas alteraciones incluyen la metaplasia de células caliciformes, incremento de la masa del músculo liso, hipertrofia de glándulas bronquiales, angiogénesis y modificaciones en los componentes de la matriz extracelular (MEC). A este conjunto de alteraciones estructurales se le denomina remodelación de las VA. Una consecuencia funcional de la remodelación es la reducción residual y permanente del calibre de las VA lo que incrementa la resistencia al flujo de aire. Todas las células de las VA incluyendo células T, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos y miocitos participan en la inflamación y pueden iniciar el proceso de remodelación de la VA (Bousquet et al, 2000).

1.3 Hiperreactividad de las vías aéreas (HVA)

La HVA se puede definir como el estado en que las VA presentan una disminución excesiva en su calibre ante estímulos que en sujetos sanos no ocasionan obstrucción alguna o, si acaso, ocasionan una de muy baja intensidad. Cuando el estímulo que se utiliza para desencadenar la respuesta obstructiva excesiva actúa a través de un mecanismo inmunitario (alergia), la HVA se denomina HVA específica. La HVA que se demuestra mediante estímulos que no son inmunitarios, como la activación de receptores por agonistas que inducen contracción como acetilcolina o histamina, se denomina HVA inespecífica (Vargas, 2005).

En la figura 1 se muestran las curvas típicas a la respuesta de HVA inespecífica en individuos con diferentes tipos de asma en relación a un individuo sano. En los individuos con asma crónica la respuesta obstructiva, evaluada con el volumen de fuerza espiratoria a primer segundo (FEV_1), se inicia por una pequeña dosis del agonista (normalmente se usa metacolina o histamina) en comparación con un individuo sano o con asma moderada, y dosis mayores pueden provocar la muerte de paciente por colapso de las VA. En un individuo con asma moderada la curva tiene un desplazamiento a la derecha, en comparación al de asma crónica, y es de tipo sigmoïdal a dosis mayores. Un individuo sano tiene una respuesta máxima limitada al 20% de la FEV_1 .

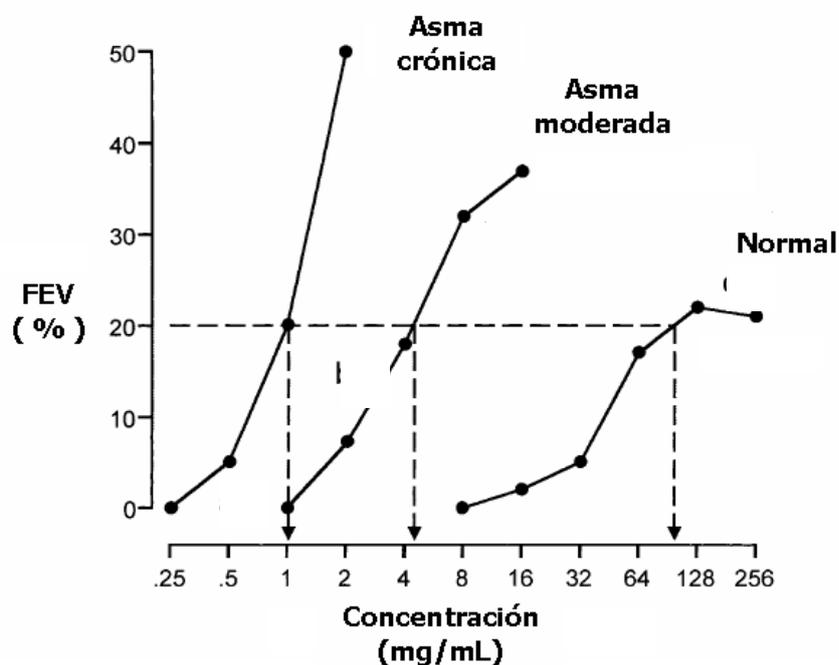


Figura1. Curva dosis-respuesta que muestra el porcentaje de cambio en relación al valor basal obtenido antes de la prueba en el volumen de fuerza espiratoria en el primer segundo (FEV_1) inducidos por retos de metacolina en individuos con asma crónica, asma moderada y sanos. (O'Byrne, 2003).

1.4 Broncoobstrucción

La broncoobstrucción limita el flujo incrementando la resistencia en la conducción de aire en la VA y puede ser resultado de la presencia de edema, la acumulación de moco, la remodelación de la VA y la contracción del músculo liso (Hogg, 2004).

1.4.1 Edema

El edema es la presencia de exudado de plasma en las VA y es consecuencia del incremento de la vascularidad, vasodilatación y fuga microvascular de los vasos de esta estructura. Este proceso es inducido principalmente por la acción de mediadores inflamatorios (Vignola et al, 2003 y Wilson, 2001)

1.4.2 Hipersecreción de Moco

La hipersecreción de moco contribuye de manera importante y persistente con la obstrucción del lumen de las VA durante el asma. El incremento en la secreción de moco y exudados inflamatorios es producto principalmente del incremento en el número de células caliciformes y en el tamaño de las glándulas de la submucosa (The Global Burden of Asthma Report, 2005).

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1) y la Interleucina- 13 (IL-13) participan en la hipersecreción de moco al incrementar la proliferación de células caliciformes (Makinde, 2007; Ying et al, 2006).

1.4.3 Músculo Liso de las Vías Aéreas (MLVA)

El MLVA es un elemento clave durante las crisis de asma, de hecho las anomalías funcionales del MLVA podrían ser las causantes de la HVA. El MLVA está formado por células mesenquimales multifuncionales capaces de expresar plasticidad fenotípica considerable. Esta plasticidad puede inducirse por varios factores, por ejemplo, la hiperplasia (proliferación) del MLVA se puede promover por mediadores inflamatorios, citocinas y factores de crecimiento, mientras que la hipertrofia (incremento en el tamaño de los miocitos) se puede inducir por episodios repetidos de broncoespasmo. En ambos casos, el MLVA incrementa su masa contribuyendo al engrosamiento de la pared de las VA. Este proceso se ha relacionado con la cronicidad y severidad del asma (Bousquet et al, 2000).

1.4.4 Contracción y relajación del MLVA

En las células de MLVA el gradiente del ion calcio (Ca^{2+}) es 20,000 veces mayor en el medio extracelular en comparación al intracelular. Este gradiente facilita la entrada de Ca^{2+} a la célula cuando el MLVA es estimulado por agonistas que inducen contracción. El incremento de Ca^{2+} intracelular facilita la interacción de la calmodulina con la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de miosina. La formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina-cinasa de la cadena ligera de miosina permite la fosforilación en la serina 19. Esta fosforilación produce una cadena de eventos que inician con la activación de la ATPasa de miosina, facilitando la interacción de los

filamentos de actina y miosina, iniciando el desarrollo de tensión muscular (Rodger, 1985). Cuando el Ca^{2+} disminuye, la cinasa de la cadena ligera de miosina se inactiva, la miosina se desfosforila y el músculo se relaja (Clinton, 2003).

Muchos agonistas que provocan la contracción del MLVA como la acetilcolina o la histamina liberan Ca^{2+} almacenado de depósitos intracelulares, principalmente del retículo sarcoplásmico (RS). La histamina se sintetiza y se libera en células cebadas, basófilos y en otras células de la mucosa de las VA. Existen 3 subtipos de receptores a histamina, H_1 , H_2 y H_3 . La histamina es un agonista para la contracción del MLVA por estimulación de los receptores H_1 (Barnes, 1998). Estos receptores están acoplados a una proteína Gq, involucrada en la formación de trifosfato de inositol (IP_3). El IP_3 es un segundo mensajero que abre canales de Ca^{2+} en el RS. Otro tipo de canales de Ca^{2+} en el RS se activan por altas concentraciones de Ca^{2+} ($1 \mu\text{M}$) y se sugiere que su función es amplificar la señalización de Ca^{2+} (Challis et al, 1993; Janssen y Sims, 1993; Kotlikoff et al, 1987 y Clinton, 2003).

1.5 Bomba de Ca^{2+} del RS

El RS y la membrana plasmática contienen bombas de Ca^{2+} que remueven el Ca^{2+} del citosol y tienen un papel importante en la relajación del MLVA. Una de las más importantes es la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA: Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase). En el MLVA se expresa la isoforma SERCA-2b (Amrani et al, 1995). Esta bomba electrogénica transporta dos moles de Ca^{2+} por mol de ATP hidrolizado hacia el interior del RS a cambio de protones (Carafoli y Stauffer, 1994). La SERCA es considerada como la principal estructura implicada en la disminución de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} después de un incremento de éste, producido por la estimulación celular (Roux y Marhl, 2004). Por otro lado, si se almacenan grandes cantidades de Ca^{2+} en el RS, la liberación masiva de este ion puede magnificar la respuesta de contracción muscular. Este es uno de mecanismos celulares que se han propuesto para explicar el desarrollo de HVA (Carbajal et al, 2005). Otro importante componente de la contracción del MLVA que podría tener un relevante papel en el desarrollo de la HVA son las integrinas.

1.6 Integrinas

Las integrinas son moléculas de adhesión celular que median interacciones célula-célula y célula-MEC. Para mediar la adhesión celular, las integrinas tienen conexiones transmembranales al citoesqueleto y activan numerosas rutas de señalización intracelular. Las integrinas y sus ligandos son indispensables para el desarrollo, respuesta inmune, tráfico de leucocitos, homeostasis y cáncer, además de participar en muchas enfermedades autoinmunitarias (Bing-Hao et al, 2007).

Las integrinas son llamadas así porque integran la información de los medios intracelular y extracelular por la unión a ligandos fuera de la célula, componentes del citoesqueleto y moléculas de señalización citosólicas. Estructuralmente las integrinas son heterodímeros asociados no covalentemente a la superficie celular. Se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β que en combinación forman los 24 pares conocidos. (Hynes, 2002). Adicionalmente, las integrinas poseen un gran dominio extracelular responsable de la unión a ligando y un dominio citoplásmico muy pequeño.

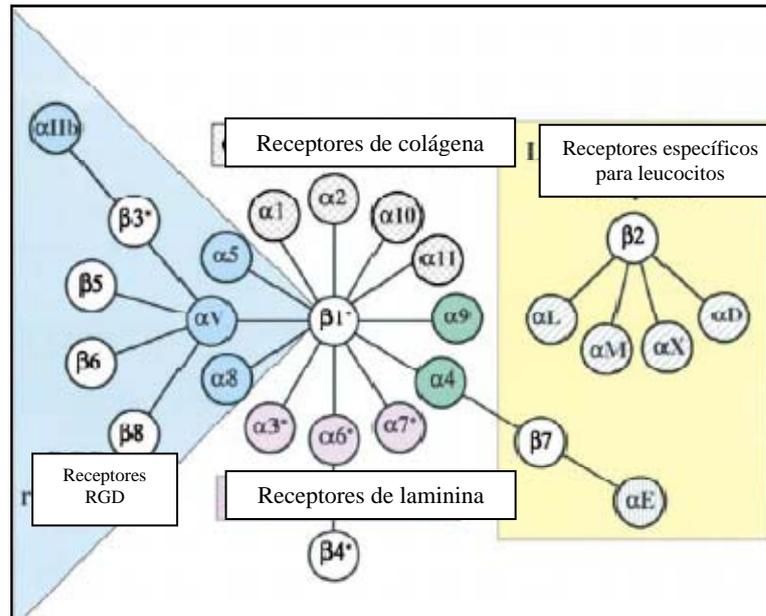


Figura 2. Familia de receptores de integrinas (Modificado de Hynes, 2002).

Una molécula específica de la MEC se puede unir a diferentes tipos de integrina e integrinas específicas pueden unirse a diferentes componentes de MEC. Un sitio donde se concentran las integrinas son los contactos focales. Estos contactos focales son muy complejos y contienen muchos componentes aun desconocidos que son modificados post-transduccionalmente y procesados proteolíticamente. Un grupo pequeño de estas proteínas de acuerdo con sus funciones revelan proteínas de citoesqueleto tensina, vinculina, α -actina, talina, así como cinasas de tirosinas, cinasas de serina-treonina, moduladores de pequeñas GTPasas, fosfatasa de tirosina y otras enzimas. Algunas de estas proteínas pueden unirse directamente a filamentos de actina y a los dominios citoplásmicos de integrinas (Zamir y Geiger, 2001).

1.6.1 Subunidad $\beta 1$ de integrina

La subunidad $\beta 1$ tiene la peculiaridad de asociarse con al menos 12 de las 18 subunidades α de integrina (de $\alpha 1$ a $\alpha 11$ y αv), (Van der Flier, 2001). Funcionalmente la subunidad $\beta 1$ de integrina (CD29) tiene un papel muy importante en procesos de

adhesión, migración, proliferación, secreción y diferenciación en muchas células. En las VA la subunidad $\beta 1$ es expresada por los miocitos, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T (Nguyen et al, 2005; Maguire y Danahey, 1995; Doucet et al, 1998 y Abraham et al, 2004).

Al ser activada la subunidad $\beta 1$ en el MLVA, por colágena monomérica tipo I y fibronectina, regula la capacidad de diferenciación, secreción y proliferación del músculo (Peng et al, 2005; Nguyen et al, 2005 y Xiao et al, 2007). Adicionalmente, la cinasa asociada a esta integrina, que interactúa con el dominio citoplásmico de la subunidad $\beta 1$, puede activar y regular la contracción del músculo liso vascular directamente por fosforilación de miosina, e indirectamente por inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (Boudreau, 1999; Liu, 2000; Hannigan et al, 1996 y Deng et al, 2002).

El tratamiento con anticuerpos contra las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ bloquean la HVA en un modelo de asma alérgica en oveja (Abraham et al, 2004). Por lo que es posible que $\beta 1$ incremente su expresión durante la remodelación de la vía aérea y tenga un papel importante en el tono, la magnitud de la respuesta al alérgeno y la reactividad de la vía aérea contribuyendo a los síntomas del asma.

Una proteína que se encuentra asociada a las integrinas es la caveolina (Cav-1), la molécula estructural principal de las caveolas y son vesículas que funcionan como plataformas de señalización celular y son muy abundantes en el MLVA (Salanueva et al, 2007; Halayko et al, 2008).

1.7 Caveolina-1

La bicapa lipídica de la membrana plasmática esta organizada dentro de dominios caracterizados por diferentes paquetes de lípidos. Esta estructura en dominios resulta del agrupamiento preferencial de esfingolípidos y colesterol, ambos con ciertas proteínas, dentro de regiones altamente ordenadas. Estas regiones son conocidas como balsas lipídicas o microdominios de membrana enriquecidos en colesterol (CEMMs). En un subconjunto de balsas lipídicas se encuentran invaginaciones celulares que van de 50 a 100 nm de tamaño (Babak et al, 2002), llamadas caveolas, que se desarrollan de la asociación de balsas lipídicas con caveolina-1 (Cav-1) y se encuentran en muchos tipos celulares. Ellas participan en varios procesos tales como el reciclamiento de lípidos, señalización celular y endocitosis. Una variedad de moléculas de señalización se localizan en la caveola ante la respuesta a varios estímulos, dando un mecanismo potencial para la regulación espacial de las rutas de transducción de señales (Salanueva et al, 2007).

La Cav-1 es sintetizada como una proteína de membrana integral y comienza a oligomerizarse en el retículo endoplásmico, luego es transportada a través del aparato de Golgi y se asocia con el colesterol y otros componentes de balsas lipídicas. La caveola muestra una motilidad y dinámica limitada en condiciones basales, pero la interacción con ligandos específicos puede llevar a su rápida internalización, involucrándose la dinamina-II, las cinasas Scr, la proteína cinasa C y el reclutamiento de actina. Durante la internalización, la caveola endocitada viaja como acarreador, se mueve dentro del citosol y se fusiona con estructuras pre-existentes llamadas caveosomas.

La internalización de CEMMs puede ocurrir cuando las integrinas se inactivan y es mediado por endocitosis de caveolas. A través de una serie de estudios, se ha visto que las integrinas regulan procesos celulares para controlar la localización de los CEMMs en la membrana plasmática. La internalización de CEMMs mediada por caveolas es efectiva para la terminación de la señalización para pérdida de adhesión (Salanueva et al, 2007).

Muchas citocinas involucradas en la patogénesis del asma, como la IL-13, el TNF- α y el TGF- β 1, han sido relacionadas con las caveolas o la Cav-1. Por ejemplo, el asma puede progresar a una fibrosis subepitelial mediada en gran parte por TGF- β 1, sin embargo la Cav-1 es capaz de inhibir la actividad de TGF- β 1, esto debido a que la formación de caveolas puede enmascarar a los receptores de esta citocina. Por otro lado, se observó que después de un reto antigénico el RNAm de Cav-1 se ve reducido en un 40%, mientras que la expresión de Cav-1 disminuye 30% probablemente por la acción de la IL-13. (Le Saux et al, 2008)

1.8 TGF- β 1

El TGF- β 1 está sobreexpresado en la VA de individuos asmáticos después de un reto antigénico y varios tipos celulares de la VA podrían contribuir a esta sobreexpresión (Boseé et al, 2005). El TGF- β 1 está relacionado con el proceso de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Estos últimos están caracterizados por incrementar la secreción de moléculas de MEC implicadas en la remodelación (Thorsson et al, 2006), además, es una proteína multifuncional ya que es uno de los reguladores más importantes en la inflamación (Khalil et al, 2001).

1.9 IL-13

En el asma, la IL-13 promueve la migración de eosinófilos, síntesis de IgE, hipersecreción de moco y la HVA. Se piensa que las células que tienen la capacidad

de secretar IL-13 en el MLVA son de origen hematopoyético (Shore, 2002), pero según Grunstein et al (2002) los miocitos tienen también la capacidad de sintetizar IL-13.

De acuerdo al tipo celular, la IL-13 tiene diferentes efectos. Por ejemplo, mientras se le ha dado un papel importante en la inflamación, también se reconoce que puede inhibir la producción de mediadores proinflamatorios en monocitos y macrófagos (Gurjit et al, 2003).

En monocitos y macrófagos, la IL-13 incrementa la expresión de varios miembros de la familia de integrinas, incluyendo α M α X, β 1 y β 2 sin embargo no se sabe si tiene un efecto similar en el MLVA (Gurjit et al, 2003).

1.10 TNF- α

El TNF- α es una citocina ampliamente estudiada y es miembro de la superfamilia de TNF. Esta citocina es secretada principalmente por macrófagos, pero también la pueden secretar monocitos estimulados, fibroblastos, células endoteliales, células T, linfocitos B, granulocitos, células de músculo liso, eosinófilos, células cebadas entre otros tipos celulares. Altos niveles de esta citocina pueden producir reacciones severas pro-inflamatorias. El TNF- α tiene un papel importante en el proceso inflamatorio del asma y se ha sugerido que su principal blanco son las células de MLVA (Mukhopadhyay et al, 2006)

Las caveolas que se encuentran en la membrana plasmática y poseen receptores para TNF- α . No obstante la relación del TNF- α con Cav-1 no es directa, ya que depende de proteínas adicionales que se encuentran en la caveola (Alessio et al, 2005)

2. Descripción del problema

En el asma, la exposición a los alérgenos en individuos atópicos generalmente produce obstrucción de las VA por contracción del MLVA (Picado, 1992). Sin embargo, existe una gran variabilidad de respuestas al alérgeno, incluyendo la de individuos atópicos que no presentan obstrucción de la VA ante la exposición al alérgeno, pero tienen HVA y algunos de ellos llegan a desarrollar asma después de varios años (Ihre et al, 1988; Custovic y Murray, 2002). Muchos factores se han asociado a la gran variabilidad de respuestas asmáticas, incluyendo el genético, las dosis de alérgeno y el grado de exposición o sensibilización (Álvarez-Puebla et al, 2001). En nuestro laboratorio tenemos un modelo de asma en cobayos sensibilizados a un alérgeno (ovalbúmina, OVA) donde estudiamos el desarrollo de la respuesta alérgica durante varios retos antigénicos (Moreno-Álvarez et al, 2003; Bazán-Perkins et al, 2006; 2007a-b). En cobayos retados hasta 12 veces con OVA, (Cada reto administrado a intervalos de 10 días) hemos observado que el 72% presenta obstrucción de las VA después del reto, mientras que el 28% no. Tres horas después de responder al reto, estos cobayos presentan infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de eosinófilos y neutrófilos, además de HVA y fibrosis subepitelial. Por otro lado, el grupo que no responde al reto no presentan inflamación inmediata, pero son hiperreactores a la histamina y presentan fibrosis subepitelial de manera similar a la de los cobayos que respondieron al reto. El análisis inmunológico indicó que ambos grupos, respondedores y no respondedores, tienen altos niveles de IgG1 (homóloga a la IgE humana) sérica específica al alérgeno (Ramos-Ramírez et al, 2008). Hasta el momento ignoramos la causa de la falta de obstrucción de las VA después del reto antigénico y hasta el momento este fenómeno no ha sido estudiado. Debido a que la obstrucción después del reto se debe principalmente a la contracción del MLVA es importante evaluar las características de este tejido en los cobayos que no responden al reto antigénico.

3. Hipótesis

Debido a que la contracción del MLVA es el principal mecanismo de obstrucción de la vía aérea después del reto antigénico, probablemente las características funcionales y fenotípicas del MLVA de los cobayos respondedores y no respondedores al reto sean diferentes.

4. Objetivos

General

Determinar las características funcionales (contracción) y fenotípicas (expresión de diferentes proteínas y mediadores pro-inflamatorios) en el MLVA de cobayos atópicos retados con el alérgeno que respondan o no al reto.

Particulares

1. Determinar el tipo de respuesta broncoobstructiva producida por el reto antigénico en cobayos sensibilizados al alérgeno.
2. Evaluar la magnitud de la contracción producida *in vitro* por la ovoalbúmina y la histamina en los cobayos del objetivo anterior.
2. Cuantificar de manera total y diferencial a las células del infiltrado inflamatorio en el lavado broncoalveolar un día después de administrado el reto antigénico en los cobayos del primer objetivo.
3. Determinar y correlacionar la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, Cav-1, SERCA-2, TGF- $\beta 1$, TNF- α e IL-13 en las células de MLVA en los cobayos antes descritos.

5. Material y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron 31 cobayos machos raza HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados de 350 a 400 g que se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER): 12/12 de ciclo luz y oscuridad, aire filtrado a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-70 % humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético y Científico del INER.

5.2 Sensibilización

En el día uno, 24 cobayos fueron inyectados por vía intradérmica e intraperitoneal (i.p.) con OVA (0.06 mg/mL, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio como adyuvante (1 mg/ml; J.T. Baker, NJ, EU), disueltos en 0.5 ml de solución salina fisiológica (SSF) (modificado de Campos et al, 2001).

5.3 Pletismografía

En el día 8 se reforzó la sensibilización de estos 24 cobayos colocándolos dentro de una cámara donde se registro el índice de broncoobstrucción (íB) basal con la ayuda de un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento (Fig. 3, Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Posteriormente se les suministró aerosoles de OVA (3 mg/ml SSF) durante 5 min con un nebulizador US-Bennet (flujo de 2 ml/min). Este nebulizador produce una mezcla de partículas con la siguiente distribución, el 44% es menor a 4 μm de diámetro, el 38% de 4 a 10 μm , y el 18% mayor a 10 μm . La cámara fue provista de un flujo de aire continuo (10 ml/s), que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. A continuación se realizó el registro pletismográfico durante una hora para obtener la respuesta máxima.

El sistema de pletismografía está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia (Bazán-Perkins et al, 2004). Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EU) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por un programa (Buxco Biosystem XA v1.1) instalado en una computadora. Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y

una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de evitar incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las respiraciones de cada período fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. Cada valor del \dot{V}_B fue el promedio de 15 segundos de lecturas y, de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período. Esto se realizó con el fin de evitar la influencia de eventos externos al estudio y mantener la posibilidad de detectar los cambios agudos.

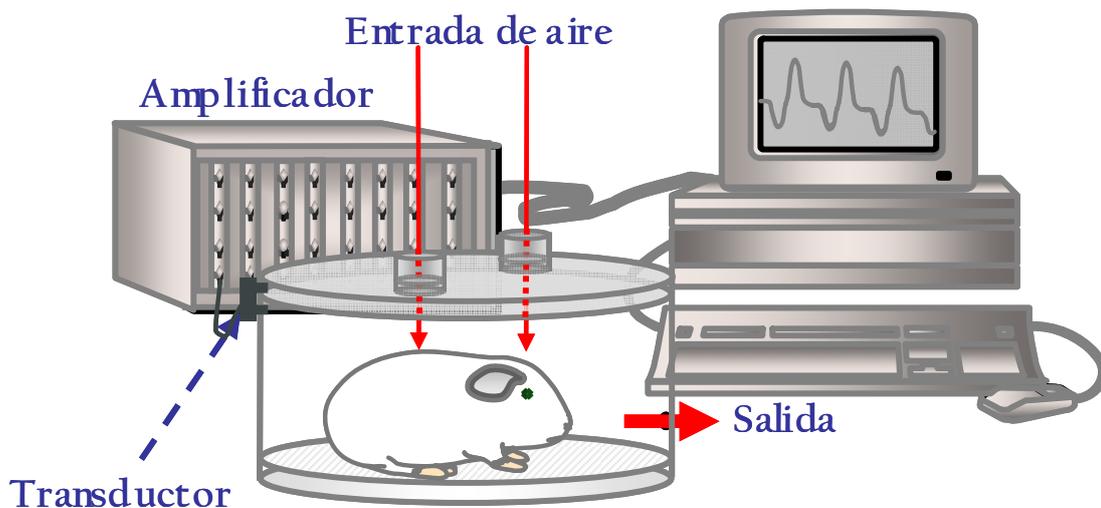


Figura 3. Dibujo del equipo de plestismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de plestismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registrara dichos cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

Los fundamentos del \dot{V}_B se basan en que cuando el aire ambiental ingresa a los pulmones se calienta de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ a 37°C y se humidifica hasta el 100%. En los sensores de la cámara de plestismografía este incremento en el volumen del aire torácico es registrado como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es temporal, pues disminuye conforme el cobayo exhala el aire. Debido a que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, durante la exhalación baja el volumen del aire y esto se registra como una disminución en la presión. De esta manera, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios el programa computacional puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración en el equipo previamente calibrado (Fig. 4; Hamelmann et al, 1997). La información es procesada para dar el valor del \dot{V}_B que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$iB = [(Te-Tr)/Tr] [PFE/PFI]$$

Donde: T_e = Tiempo total espiratorio (s)

T_r = Tiempo total de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (presión positiva máxima, cmH_2O)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH_2O)

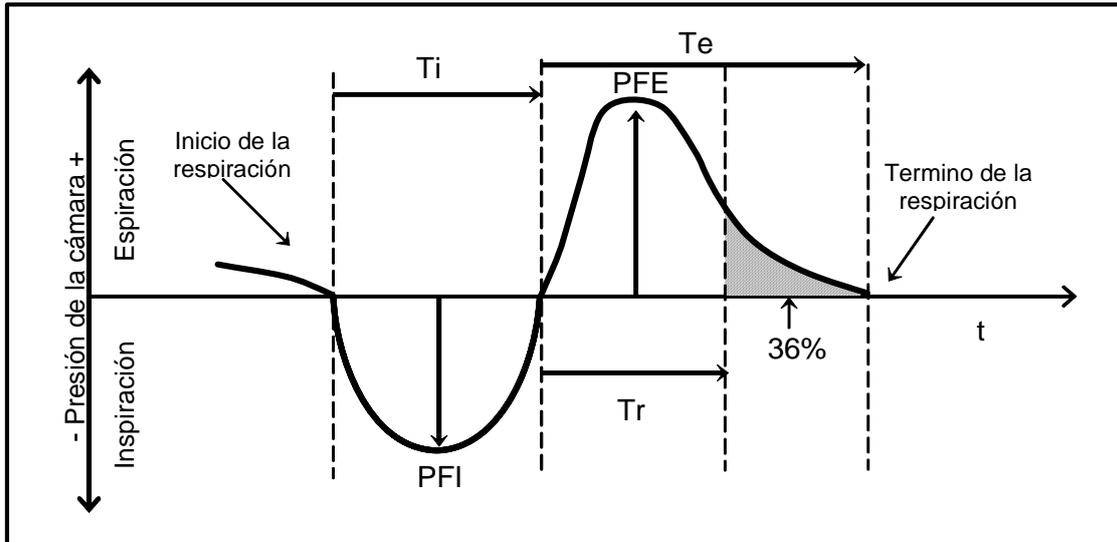


Figura 4. Esquema de una onda de presión dentro de la cámara durante la inspiración y la espiración en un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un animal en libre movimiento. El tiempo inspiratorio (T_i), es el intervalo de tiempo ocurrido desde el inicio de la inspiración hasta el final de ésta. El T_e comprende el siguiente intervalo que inicia desde el final de la inspiración hasta el inicio de la siguiente. El T_r es el tiempo que transcurre entre el inicio de la espiración hasta que el volumen corriente caiga al 36% durante la espiración. El PFE y el PFI se obtienen midiendo la presión positiva y negativa máximas registradas en un ciclo respiratorio. T: tiempo (s). Tomado de Hamelmann et al, 1997.

En el día 15, los 24 cobayos fueron expuestos nuevamente a aerosoles de OVA (1mg/ml SSF) durante un minuto siguiendo el protocolo de pletismografía del día de refuerzo antigénico (Día 8). En este día 12 cobayos fueron sacrificados para obtener lavado broncoalveolar (LBA) y músculo liso traqueal como se describirá mas adelante. Los restantes 12 cobayos fueron retados once veces mas, cada una a intervalos de diez días, usando 0.5 mg de OVA/ml de SSF, antes de ser sacrificados para obtener las mismas muestras que los cobayos del día 15 o primer reto. Un grupo adicional de cobayos que no fueron retados ni sensibilizados fueron incluidos en el estudio como controles.

5.4 Conteo celular total y diferencial en el lavado broncoalveolar (LBA)

Veinticuatro horas después del primer o doceavo retos antigénicos, los animales fueron sobredosificados con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (28 mg/kg) y una vez que se observó paro cardiorrespiratorio se realizó una traqueotomía. Posteriormente se introdujo una cánula endotraqueal por donde se administró, utilizando una jeringa, 5 ml de SSF estéril a 37°C, solución que se recuperó 1 min después lentamente. Este procedimiento se repitió y el fluido recuperado se mezcló con el primero. El LBA obtenido se centrifugó durante 10 min a 1 500 rpm (4 °C) en una centrífuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania) y el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de SSF. Para establecer el número total de células en el LBA, se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se colocaron en 40 µl de azul de tripan al 0.4%. Se obtuvieron 10 µl de esta mezcla para depositarse en una cámara de Neubauer donde se realizó el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5), después por el factor de la cámara (10,000) y se expresó como el número de células por mililitro de LBA. Por otro lado, el volumen celular se ajustó hasta tener 1×10^6 cél/ml adicionando SSF y de estos se colocaron 50 µl en una citrocentrífuga (7120 Aerospray Wescor Cytospin, EU) para realizar un frotis celular que fue teñido con la tinción Romanowsky para conteo diferencial. Esta tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Wescor. USA), como colorantes principales, para dar las siguientes tonalidades: núcleo en púrpura, eritrocitos en rosa, gránulos de neutrófilos en púrpura y gránulos de eosinófilos en rosa-naranja. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz (Karl Zeisz, Alemania) a un aumento de 100x.

5.6 Disgregación celular

Las células de MLVA fueron disgregadas de la tráquea de los cobayos. Para esto, una vez disecada la tráquea, se eliminó la fascia superficial para seccionar la tráquea dorsalmente a lo largo de su eje. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se quitaron las capas de mucosa, epitelio, serosa y vasos sanguíneos hasta obtener una tira de músculo liso. Esta tira fue colocada de 5 ml de solución Hank's (Gibco, New Cork, EUA) que contenía 2 mg de cisteína y 0.05 U/ml de papaína para incubarse en esta solución durante 10 min a 37° C. Posteriormente el tejido fue lavado con una solución de Leibovitz (Gibco, New Cork, EUA) para remover el exceso de enzima y después se colocó en solución de Krebs (composición (mM): 118 de NaCl, 25 de NaHCO₃, 4.6 de KCl, 1.2 de KH₂PO₄, 1.2 de MgSO₄ y 11 de glucosa,

todos de Sigma, USA) que contenía 100µl de Liberasa (Roche, EUA). En esta solución se llevo a cabo una segunda incubación durante 10 min a 37° C, hasta que las células se observaron disgregadas mediante agitación mecánica. Se corroboró la disgregación mediante la obtención de alícuotas que se observaron en microscopio. Una vez disgregadas las células, toda actividad enzimática fue detenida completamente adicionando solución de Leibovitz (Gibco, New Cork, EUA). Posteriormente las células disgregadas fueron concentradas mediante centrifugación a 600 rpm durante 5 min, se desecho el sobrenadante conteniendo las enzimas, y este procedimiento se repitió una vez más.

5.7 Citometría de flujo

Las células de MLVA se incubaron por cuatro horas a 37° C en baño maría en 1 ml de RPMI (Gibco, EUA) y 4 µl de brefeldina A (Sigma, EUA) por cada millón de células para los grupos controles y 1ml de RPMI (Gibco, EUA), 4µl de brefeldina A (Sigma, EUA), 10µl de forbol 12-miristato,13-acetato y 5µl de ionomicina (Sigma, EUA) por cada millón de células para los grupos experimentales. Posteriormente se permeabilizó la membrana con 1.5 ml de saponina (Sigma, EUA) 0.1%, albúmina sérica de bovino (Sigma, EUA) 10%, HEPES (Sigma, EUA) 0.01M y 100µg/µl de IgG de cerdo disuelto en 100 ml de PBS por 10 min agitando suavemente a temperatura ambiente. Después se incubaron las células con anticuerpos primarios contra SERCA-2 (Biomol, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células, IL-13 (BD Biosciences Pharmingen, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células, Cav-1 (BD Biosciences Pharmingen, EUA) con 3µl por 1x10⁶ células, TNF-α (R&D Systemns, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células, TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células, CD29 dominio citosólico (Chemicon, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células y el ectodominio de CD29 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) con 1µl por 1x10⁶ células, y con los respectivos anticuerpos se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se lavaron las células con 1.5 ml de solución saponina, y 0.1%, HEPES 0.1M disuelto en 300 ml de PBS. Se incubó durante 30 min a las células con los anticuerpos secundarios FITC mouse 1µl (BD Biosciences Pharmingen, EUA), PE mouse 1µl (BD Biosciences Pharmingen, EUA) y Cy5PE rabbit 1µl (Santa Cruz Biotechnology, EUA) en las condiciones antes mencionadas. Se lavaron de nuevo con 1.5 ml de solución saponina 0.1%, HEPES 0.1M disuelto en 300 ml de PBS y por último se analizó en el citómetro de flujo (Becton & Dickinson FACScan model Scallibur).

5.8 Estudio en órganos aislados

Algunas traqueas fueron removidas y colocadas en una caja de Petri con solución Ringer Krebs a temperatura ambiente. Se removió cuidadosamente el tejido conjuntivo y se obtuvo un anillo traqueal de longitud aproximada de 5 mm utilizando un microscopio estereoscópico (Kart Zeisz, Alemania). El anillo traqueal fue suspendido en una cámara de órganos aislados que contenía 5 ml de solución Ringer Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.77, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, CaCl_2 2.5, y glucosa 11 (Todos de Sigma, EUA). A esta solución se le administró 1 μM de indometacina, para evitar la síntesis de prostaglandinas endógenas. Además, la solución fue continuamente burbujeada con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 a 37° C. Posteriormente el anillo traqueal se mantuvieron en equilibrio por un periodo de una hora a una tensión de 1 g. La tensión fue registrada con un transductor de tensión isométrica (Grass FT03, Grass Instruments, CA, EUA). Para obtener los datos y registros de la contracción del músculo liso traqueal se utilizó el software de Axon Instruments, Inc. (Foster City, CA). Cada anillo traqueal fue estimulado con KCl 60 mM tres veces hasta obtener una respuesta máxima estable, y establecer la viabilidad del tejido. Posteriormente se administró 3.74 $\mu\text{g/ml}$ de OVA durante 20 min, posteriormente se lavó la OVA y se estimuló con histamina (10 μM) durante otros 20 min.

6. Resultados

6.1. Tipo de respuesta

De los 12 cobayos estudiados en el primer reto solo 9 presentaron broncoobstrucción (Respondedores; Fig. 5) de los cuales 7 fueron estudiados debido a que 2 murieron inmediatamente después del reto. Por otra parte, de los 12 que se estudiaron hasta el doceavo reto (día 125), 7 cobayos tuvieron broncoobstrucción después del reto, pero solo 5 fueron parte del estudio por que 2 murieron durante los retos. El resto de los cobayos de ambos grupos nunca respondieron a los retos (No respondedores; Fig 5a). El promedio de \dot{V}_B máximo alcanzado en el grupo de cobayos que respondieron a los retos fue del $543 \pm 65\%$ (valores en relación a su respectivo \dot{V}_B basal, $n=10$). Este valor fue significativamente mayor en comparación al observado en el grupo de cobayos que no respondieron a los retos antigénicos ($193 \pm 20\%$, $n=5$, $p<0.0001$). La administración de OVA ($3.74 \mu\text{g/ml}$) en las traqueas de los cobayos respondedores del primer o doceavo retos siempre produjo contracción muscular ($1.6 \pm 0.4 \text{ g}$; $n=10$). Las traqueas de cobayos de primer o doceavo retos no respondedores presentaron una respuesta aproximadamente 10 veces menor a la de los respondedores ($0.15 \pm 0.08 \text{ g}$; $n=7$; Fig 5b). Las respuestas a $10 \mu\text{M}$ histamina fueron similares en ambos grupos (respondedores $1.9 \pm 0.5 \text{ g}$, $n=10$; no respondedores $1.4 \pm 0.6 \text{ g}$, $n=7$; Fig 5c).

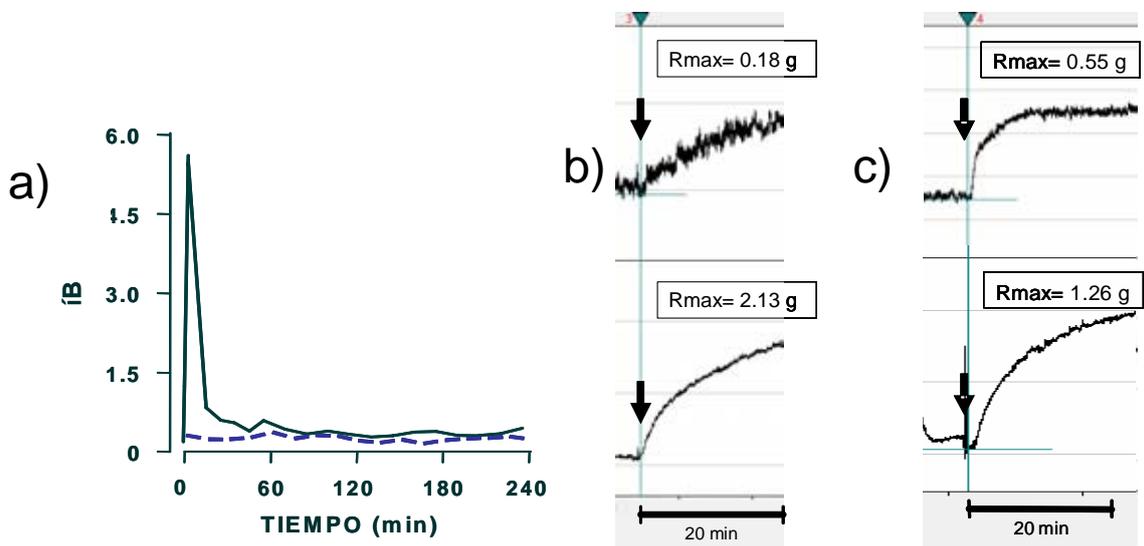


Figura 5. Respuesta *in vivo* e *in vitro* a la ovalbúmina en cobayos sensibilizados. a) Gráfica de la respuesta típica de broncoobstrucción (línea continua) después de la administración de aerosoles de ovoalbúmina en cobayos sensibilizados. En líneas punteadas se muestra el trazo típico de un cobayo que no responde al reto con ovoalbúmina. b) Contracción producida por la ovoalbúmina y c) histamina en la traquea de cobayos sensibilizados en su doceavo reto. Los paneles superiores corresponden a un cobayo no respondedor, los inferiores a un respondedor. Rmax: respuesta máxima de contracción a la ovalbúmina o histamina. Las flechas indican el momento de administración de los fármacos.

6.2 Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar (LBA)

El número de células totales, linfocitos, neutrófilos y macrófagos en el LBA del grupo control fue de 3080769 ± 519107 , 101890 ± 26602 , 118936 ± 26761 y 1817378 ± 294439 células/ml, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes a los observados en los días 15 y 125 tanto en los cobayos que respondieron como en los que no respondieron al reto.

El número de eosinófilos aumentó significativamente en el primer reto tanto en los cobayos que respondieron al reto ($p < 0.01$, $n = 5$) como en los que no respondieron ($p < 0.01$, $n = 3$), así como en los retos doce veces y respondieron al reto ($p < 0.05$, $n = 5$) como en los que no respondieron ($p < 0.05$, $n = 5$, Fig. 6) en relación al grupo control.

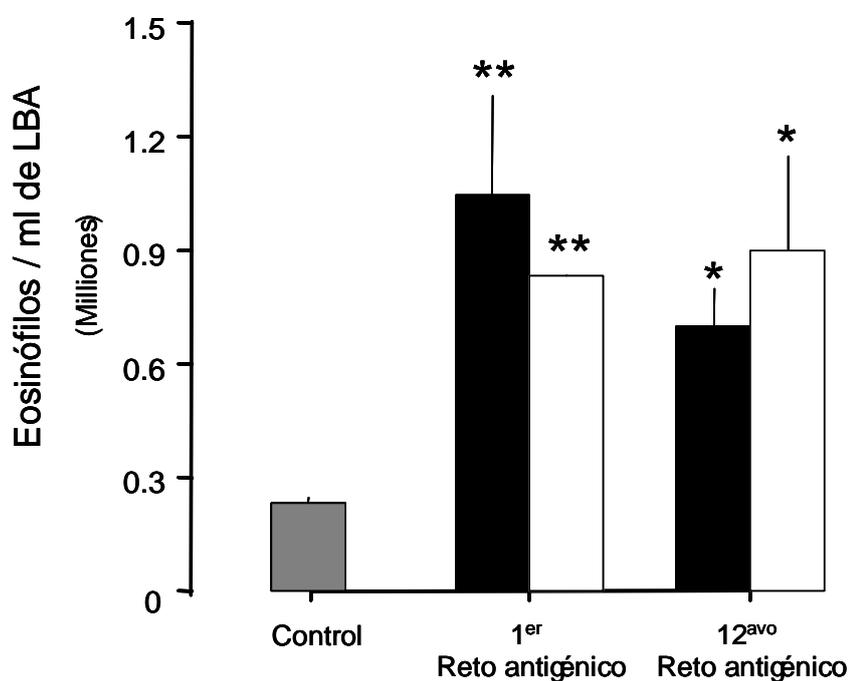


Figura 6. Conteo de eosinófilos en el lavado bronquioalveolar en los animales que respondieron al reto antigénico (barras negras) como en los que no respondieron (barras blancas). Las barras representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en comparación al grupo control (Anova de una sola vía, con la prueba de comparación múltiple de Dunnett).

6.3 Expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el MLVA

La expresión del dominio citoplasmático o endodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina aumento su expresión significativamente en el grupo de cobayos que respondieron a los 12 retos antigénicos en relación al grupo control ($p < 0.01$; Fig. 7). En el grupo de cobayos que no respondieron a los retos antigénicos la expresión del dominio citoplasmático aumento significativamente desde el primer reto ($p < 0.05$) y este incremento se mantuvo hasta el doceavo reto ($p < 0.01$). Adicionalmente, la expresión del endodominio fue significativamente mayor en los respondedores que en los no respondedores en el primer reto ($p < 0.05$). Con respecto al dominio extracelular o ectodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina, su expresión aumentó significativamente en el grupo de 12 retos antigénicos tanto en cobayos respondedores ($p < 0.01$) como en los no respondedores ($P < 0.05$). El coeficiente de correlación de la expresión del ectodominio con el endodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina fue altamente significativo ($n=27$, 0.846 , $p < 0.0001$; Tabla 1).

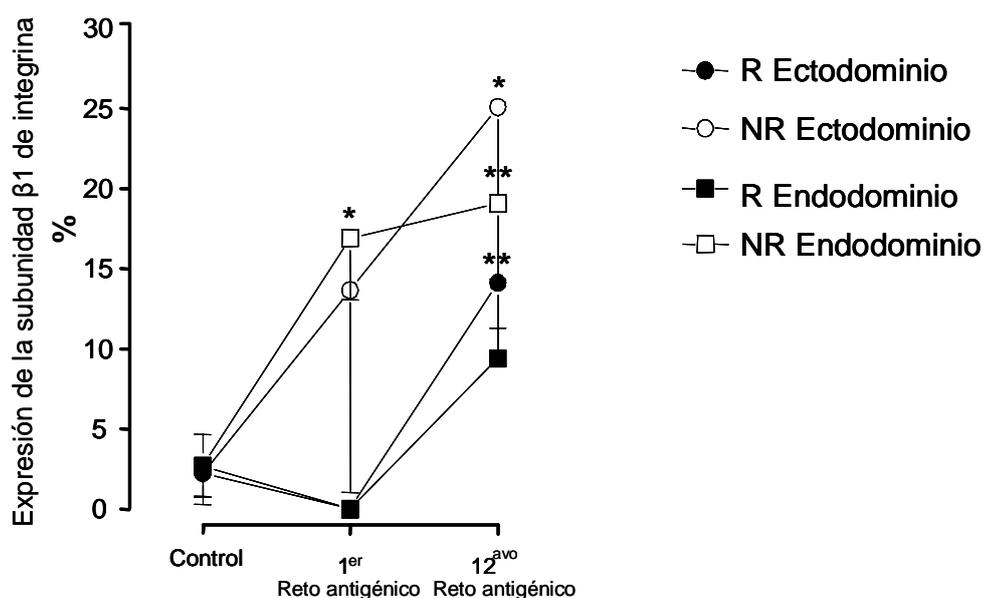


Figura 7. Expresión del endodominio y ectodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el MLVA en los cobayos que responden al reto (R) como en los que no responden (NR). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en comparación al control y entre los endodominio de la integrina en respondedores y no respondedores (Anova de una sola vía, con la prueba de comparación múltiple de Dunnett).

6.4 Expresión de la Cav-1 y SERCA-2 en el MLVA

En las figuras 8 y 9 se muestran las gráficas de la expresión de la Cav-1 y SERCA-2 en el MLVA, respectivamente. Tanto la expresión de Cav-1 como de SERCA-2 en los cobayos que respondieron al reto como los que no respondieron, no tuvo diferencias significativas.

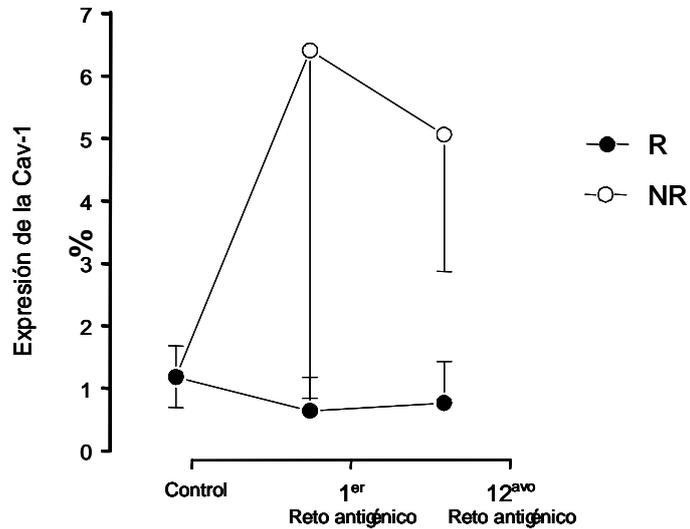


Figura 8. Expresión de la Cav-1 en el MLVA en cobayos que responden al reto (R) como en los que no responden (NR). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar.

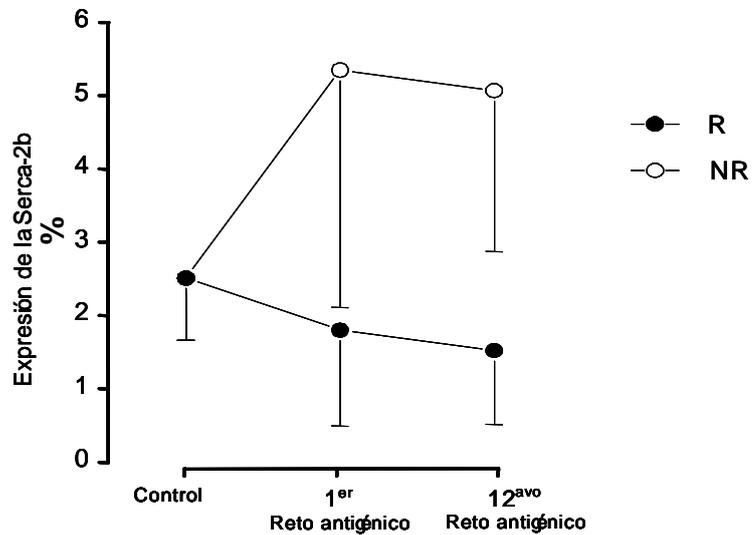


Figura 9. Expresión de la SERCA-2 en el MLVA músculo liso de las vías aéreas en cobayos que responden al reto (R) como en los que no responden (NR). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar.

6.5 Expresión de TNF- α , TGF- β 1 e IL-13 en el MLVA

La expresión de TNF- α y TGF- β 1 en el MLVA fue evaluada solo para el primer reto debido a que hubo problemas técnicos para evaluar su expresión en el grupo de doce retos. La expresión de TGF- β 1 en el MLVA aumentó significativamente en el primer reto en los cobayos respondedores tanto en comparación con los controles como con los cobayos que no respondieron al reto ($p < 0.05$; Fig. 10A). La expresión de TNF- α no se modificó en ningún grupo (Fig. 10B).

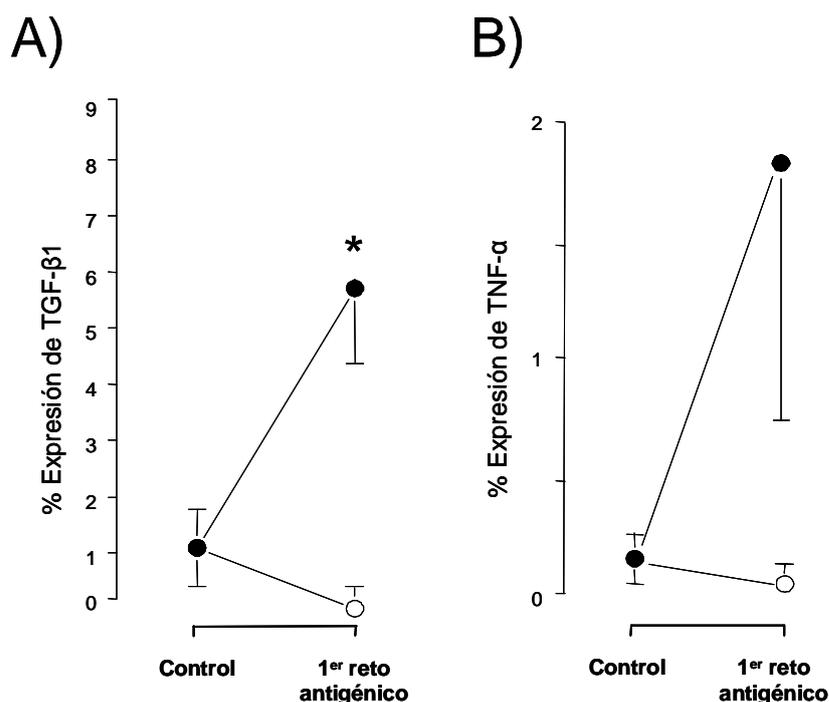


Figura 10. Expresión del TGF- β 1 y TNF- α en el MLVA en cobayos que responden al reto (Círculos llenos) como en los que no responden (Círculos vacíos). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$ en comparación al control y entre respondedores y no respondedores (Anova de una sola vía, con la prueba de comparación múltiple de Dunnett).

En la figura 11 se muestra la expresión de la IL-13 en estos grupos. No se encontró diferencias significativas.

En la tabla 1 se muestran los coeficientes de correlación de la expresión de los dominios intracelulares y extracelulares de la subunidad β 1 de integrina, SERCA-2, Cav-1, TGF- β 1, TNF- α e IL-13 en el MLVA. La expresión del endodominio de la subunidad de β 1 integrina tuvo correlación positiva y estadísticamente significativa con la expresión del ectodominio de β 1 integrina ($p < 0.0001$), SERCA-2b ($p < 0.05$), Cav-1 ($p < 0.05$) e IL-13 ($p < 0.001$). A su vez la expresión del ectodominio de la subunidad β 1 de integrina correlaciono positivamente con la expresión de Cav-1 ($p < 0.0001$) e IL-13 ($p < 0.05$). Por otro lado, también se observó significancia en el coeficiente de

correlación entre la expresión de TGF- β 1 con la expresión de SERCA-2 ($p < 0.05$) y TNF- α ($p < 0.05$), y entre la expresión de IL-13 con la expresión de SERCA-2 ($p < 0.001$) y Cav1 ($p < 0.001$).

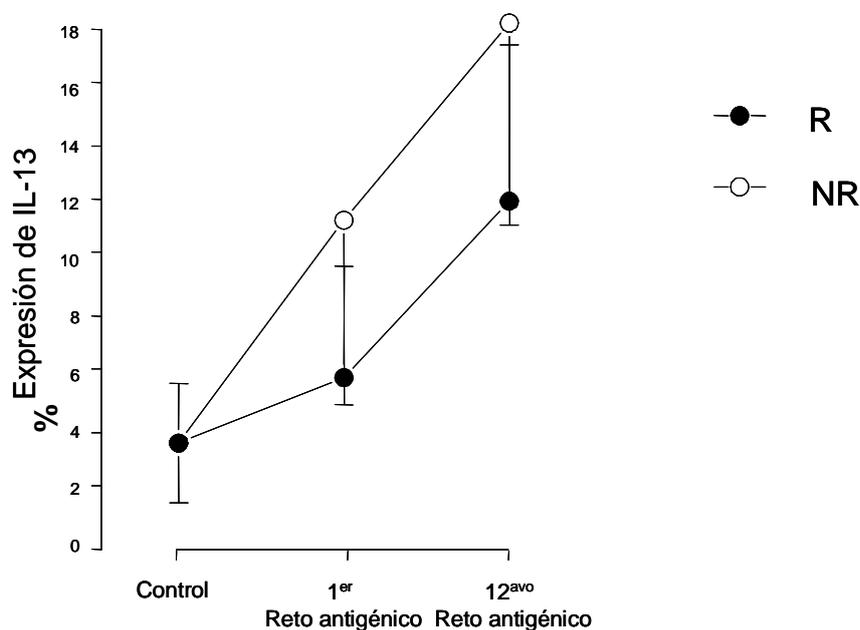


Figura 11. Expresión de la IL-13 en el MLVA en cobayos que responden al reto (R) como en los que no responden (NR). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar.

Tabla 1. Coeficientes de correlación de la expresión de los dominios intracelulares y extracelulares de la subunidad β 1 de integrina (CD29), la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA-2b), la caveolina (Cav-1), el TGF- β 1, el TNF- α y la IL-13 en el músculo liso de las vías aéreas.

	CD29 (ectodominio)	SERCA- 2b	Cav1	TGF- β 1	TNF- α	IL-13
CD29 (endodominio)	0.846 ***	0.528 *	0.487 *	0.272	0.286	0.500**
CD29 (ectodominio)	—	0.286	0.661 ***	0.084	0.460*	0.519**
Serca-2b	—	—	0.279	-0.436*	-0.235	0.606 **
Cav1	—	—	—	-0.216	0.020	0.575 **
TGF-β1	—	—	—	—	0.488*	-0.030
TNF-α	—	—	—	—	—	-0.142

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, Prueba de *T* de Student pareada, $n = 27$ en todas las correlaciones, salvo TNF- α y TGF- β 1, donde fue de $n = 17$.

7. Discusión

Nuestros resultados sugieren que el MLVA puede desarrollar dos fenotipos de acuerdo a la respuesta broncoobstructiva presentada después del reto, si broncoobstruye después del reto antigénico presenta altos niveles de TGF- β 1, pero si no, expresa altos niveles de la subunidad β 1 de integrina. Estos cambios fenotípicos ocurrieron desde el primer reto antigénico (día 15). De acuerdo al plan de sensibilización, desde este primer reto antigénico, la exposición a los aerosoles con OVA debió inducir una broncoobstrucción inmediata cuya magnitud triplicara, por lo menos, el íB basal (Campos et al, 2001). La presencia de dos patrones de respuesta, respondedores y no respondedores, ha sido frecuentemente observada en nuestra población de cobayos desde hace 10 años (72% responden, 28% no responden, $n=98$) y el mecanismo por el cual se presentan estos dos tipos de respuesta se puede deber a la expresión de integrinas β 1 y TGF- β 1 como se discutirá más adelante. Hemos verificado que tanto los cobayos que responden como los que no responden al reto sean atópicos, pues ambos presentan niveles séricos similares de IgG1 (homóloga a la IgE humana) específica para el alérgeno y en ambos casos significativamente mayores a los controles.

La contracción del MLVA es el principal mecanismo involucrado en la obstrucción de la VA producida por el reto antigénico (Vargas, 2005; Barnes, 1998). El MLVA presenta gran plasticidad fenotípica que está bajo el control de los estímulos externos, como factores de crecimiento o la MEC, y es regulado por una red de cascadas de señalización que controlan la expresión de diferentes proteínas. Estos fenotipos podrían contribuir con la magnitud de la respuesta de contracción del MLVA (Halayko et al., 2008). Por eso verificamos la funcionalidad del MLVA en los no respondedores al reto antigénico. Los estudios *in vitro* sugieren que existe una alteración en la respuesta inmunológica desencadenada por la OVA en los cobayos que no responden al reto debido a que la adición del antígeno apenas produce contracción. No obstante, podemos descartar una alteración en la maquinaria contráctil o en la expresión de receptores a histamina, ya que observamos que la administración de histamina provocó contracción en los no respondedores y que la expresión de los receptores H1 fue similar en ambos grupos (datos no mostrados). Previamente hemos observado (datos no publicados) que los cobayos no respondedores en su tercer reto tienen una hiperreactividad mayor que los respondedores del mismo día. Esto nos sugiere la posibilidad de que los cambios fenotípicos de MLVA que observamos en el primer reto antigénico con el incremento en la expresión de integrina β 1 y la disminución de TGF- β 1 podrían estar implicados

en la exacerbada hiperreactividad que observamos en el tercer reto antigénico. Esto será verificado en un futuro en un grupo de cobayos en su tercer reto.

En la población humana existe una gran variabilidad en la manifestación del asma atribuida a factores genéticos, dosis de alérgeno y grado de exposición o sensibilización (Álvarez-Puebla et al, 2001). En particular, se ha visto que existen individuos atópicos que no presentan crisis de asma ante la exposición al alérgeno, pero tienen HVA (Ihre et al, 1988 y Custovic y Murray, 2002). Cockcroft y colaboradores (2006) observaron que estos individuos atópicos que no responden a los retos antigénicos llegan a responder cuando son sometidos a grandes concentraciones de antígeno. Es probable que esto suceda con los cobayos, no obstante consideramos que el estudio de las características fenotípicas de las VA de los cobayos que no responden al reto antigénico es un tema interesante de estudio que podría estar relacionado con la tolerancia inmunológica, ya que la expresión o inhibición de proteínas y elementos celulares pueden estar jugando papeles importantes en el tipo de respuesta.

La eosinofilia es una característica importante del asma (Broadley y Toward, 2004). Previamente habíamos observado en este modelo de asma que una hora después del reto antigénico los cobayos que broncoobstruyen presentan neutrofilia y eosinofilia en el LBA (Bazán-Perkins et al, 2007), pero los no respondedores no presentaron cambios en el número de células en el LBA (Ramos-Ramírez et al, 2008). En este estudio observamos que 24 h después de la exposición al reto antigénico hay un gran infiltrado de eosinófilos tanto en respondedores como en no respondedores y que este fenómeno se observa desde el primer reto antigénico. Esto nos sugiere que de manera no inmediata pero en el rango de las 24 h se desencadena una respuesta inmunológica en los cobayos no respondedores al reto. Durham y Kay (1985) observaron que la eosinofilia a las 24 hrs se relaciona con la respuesta alérgica tardía posiblemente por la respuesta de la médula ósea al reclutamiento de eosinófilos. Es importante mencionar que el grupo no respondedor no presenta obstrucción de las VA tardía, por lo que la eosinofilia no está determinando la presencia de respuesta tardía en nuestro modelo.

Se sabe que la expresión del ectodominio de la subunidad $\beta 1$ de integrina en los cobayos respondedores crónicos se incrementa en las VA, incluyendo al MLVA (Bazán-Perkins et al, 2007). En este trabajo vimos que el incremento en la expresión de la integrina en el MLVA sucede en los no respondedores desde el primer reto, lo que sugiere que se puede desarrollar un diferente fenotipo de MLVA de manera temprana. Debido a que las integrinas son fundamentales para que se lleve a cabo la

contracción del MLVA (Zhang y Gunst, 2008), sería interesante determinar si esa sobreexpresión se asocia con la activación de la integrina, lo que podría explicar por que los cobayos con alta expresión de integrina no responden al reto.

La expresión del ectodominio de la subunidad $\beta 1$ integrina en cobayos respondedores crónicos llega a observarse en zonas acelulares asociada a fibras de colágena tipo I y II (Bazán-Perkins et al, 2007). Esta “perdida” del ectodominio de una proteína durante procesos inflamatorios es común para muchos receptores de citocinas (Garton et al, 2006). En particular, resulta interesante conocer el tipo celular que perdió el ectodominio de subunidad $\beta 1$ de integrina. Nuestros resultados sugieren que debido a que la correlación entre el endodominio y el ectodominio de la subunidad de $\beta 1$ de integrina es positiva y cercana uno, es probable que el MLVA no sea el tipo celular que haya perdido el ectodominio de esta integrina.

Las integrinas se encuentran en la membrana plasmática, dentro de adhesiones focales y su principal mecanismo de endocitosis es mediante caveolas. La proteína estructural principal de las caveolas, la Cav-1, se ha relacionado con transducción de señales importantes para la contracción del músculo liso (Salanueva, 2007; Gosens, 2006). En este estudio observamos que la expresión de la Cav-1 se correlaciona con la de la subunidad $\beta 1$ de integrina, pero su expresión no dependió de la respuesta funcional de los cobayos ante el reto antigénico.

Otra proteína fundamental para la contracción del MLVA es SERCA-2b que es responsable de mediar la contracción a través del rellenado de los almacenes de Ca^{2+} del RS. Se sabe, por ejemplo, que la actividad de esta bomba es importante para la HVA (Carbajal, 2005), por lo que su sobreexpresión podría relacionarse con una sobrecarga de Ca^{2+} en el RS. En este trabajo no observamos modificaciones en la expresión de SERCA-2, un anticuerpo que reconoce los subtipos SERCA-2a y 2b, ni por el número de retos ni por la respuesta funcional al antígeno. No obstante, la expresión de la bomba se correlacionó positivamente con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina y con la IL-13, ambas moléculas son capaces de favorecer la contracción del MLVA (Zhang y Gunst, 2008; Tilba et al, 2003). Por otro lado, la expresión de SERCA-2 se correlacionó inversamente con la expresión de TGF- $\beta 1$, una citocina considerada como anti-inflamatoria y con efectos contradictorios en la contracción durante el asma (Bossé et al, 2007). En este sentido, para entender la relación de TGF- $\beta 1$ en este modelo, es necesario que podamos evaluar no solo su expresión, sino su nivel de activación.

Con respecto a TGF- β 1, los animales respondedores en el primer reto antigénico incrementan su expresión de manera significativa con respecto al control y a los no respondedores. En este punto se puede ver el cambio en el fenotipo del MLVA y es importante mencionar que no se ha descrito previamente este tipo de cambios en el MLVA.

Las integrinas y el TGF- β 1 tienen una relación estrecha, debido a que las integrinas pueden activar al TGF- β 1 que se encuentra asociado a un gran complejo latente en la matriz extracelular. En este sentido, Wipff y Linz (2008) sugieren dos modelos por los cuales las integrinas pueden activar a TGF- β 1, el primero es un mecanismo dependiente de proteasas y el segundo a través de un cambio conformacional por las fuerzas de atracción que están generando las integrinas contra esta citocina. Esto reitera la necesidad de orientar el trabajo en relación a la determinación del TGF- β 1 que se encuentra activado en este modelo de asma.

El TNF- α tiende a incrementar su expresión en los animales respondedores al primer reto antigénico lo que posiblemente indique que esta citocina pro-inflamatoria tenga una gran importancia en el desarrollo del asma en sus primeras etapas y que de aquí desencadene muchos procesos relacionados con la enfermedad en etapas tardías. Sin embargo en los animales no encontramos modificaciones en el nivel de expresión de esta citocina, salvo su correlación positiva con la expresión de TGF- β 1 y la subunidad β 1 de integrina. Esta última correlación podría ser resultado de la regulación positiva de las integrinas que es capaz de llevar a cabo el TNF- α (Montecucco et al, 2007).

La IL-13 es reconocida como una de las principales citocinas en la regulación de muchos patrones en el asma (Wills-Karp, 1998). Entre las correlaciones mas significativas que observamos en este trabajo se encuentra la de la IL-13 con ambos dominios de la β 1 integrina, SERCA-2b y Cav-1. Debido a la importancia de la expresión de todas estas moléculas en el asma, es probable que alguna de ellas, muy probablemente la IL-13, esté regulando positivamente la expresión de todas las demás, ya que fue la citosina que correlacionó de forma positiva y significativa con la subunidad β 1 integrina, SERCA-2b y Cav-1, sin embargo se necesita hacer otro tipo de experimentos para confirmar lo antes mencionado. Una evidencia a favor de que la IL-13 sea este regulador es el trabajo de Grunstein y colaboradores (2002) donde propusieron que la IL-13 tiene comunicación autócrina en el MLVA y que es la responsable de mediar procesos tales como la reactividad alterada de éste tejido en animales sensibilizados con IgE.

Hay estudios que indican que la integrina $\alpha V\beta 1$ que se encuentra en células de músculo liso en ave participa de manera importante en la regulación de contracción del músculo liso (Dahm and Bowers, 1998). Scaffidi (2001) en un estudio *in vitro* con miofibroblastos mostró que la integrina $\alpha V\beta 1$ tiene una regulación positiva en la contracción de músculo liso en enfermedades pulmonares como el asma y fibrosis pulmonar. Scherberich y colaboradores (1998) determinaron en un modelo *in vitro* mediante el bloqueo de las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha V\beta 1$ que la contracción del músculo liso vascular en humano se abolía, dando un papel a las integrinas muy importante en la contracción del músculo liso. En un modelo *in vitro* (Yee et al, 1998) con células de músculo liso vascular demostró que con el bloqueo de la integrina $\alpha V\beta 1$ la contracción se pierde en estas células vasculares. Por otro lado (Wipff, 2007) las integrinas activan al TGF- $\beta 1$ para que se pueda llevar a cabo la contracción muscular y la progresión de la fibrosis. En un modelo de Alzheimer en ratón (Tong, 2007) demostraron que las arterias cerebrales inducidas por TGF- $\beta 1$ contraían de manera importante, dándole un papel a TGF- $\beta 1$ en la contracción. Liu (2007) probó que los tipos de señalización del TGF- $\beta 1$ son distintos, ya que puede llevar la organización del citoesqueleto, contracción, expresión de genes pro-fibróticos e incrementar los efectos patológicos y fisiológicos en la remodelación de tejido conectivo.

Nuestro modelo hecho en cobayos, en MLVA es una representación *in vivo* como un acercamiento a lo que pasa en el asma, la cual es vista como una enfermedad inflamatoria que ofrece una nueva visión de un proceso complejo, mediado por docenas y posiblemente cientos de mediadores (Leff et al, 1991). Posiblemente en nuestro modelo hay alguna interacción de la subunidad $\beta 1$ integrina con otro tipo de subunidad α en el MLVA, que en el grupo de animales no respondedores, ésta integrina tenga efectos negativos en la contracción del MLVA después del reto antigénico y que esta misma integrina tenga efectos negativos en TGF- $\beta 1$. Es necesario hacer más experimentos para corroborar lo antes mencionado.

8. Conclusiones

1. Nuestros datos sugieren que en el primer reto antigénico se manifiestan dos fenotipos de músculo liso de las vías aéreas:

-Uno donde no hay broncoobstrucción ante el reto antigénico y el músculo liso de las vías aéreas tienen una gran expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina. La expresión de la integrina se modifica en los subsecuentes retos pero la no respuesta después del reto se mantiene.

-Otro donde hay broncoobstrucción ante el reto antigénico y el MLVA expresa niveles elevados de TGF- $\beta 1$.

2. El ectodominio libre de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el asma crónica asociado a la colágena probablemente no proviene del músculo liso de las vías aéreas.

9. Referencias

1. Abbas K Abul and Lichtman H Andrew (2007) **Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System**. Second edition Saunders Elsevier.
2. Abraham WM, A. A., Serebriakov I, Carmillo AN, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber EA, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Taylor F and Lobb RR. **A monoclonal antibody to $\alpha 1\beta 1$ blocks antigen-induced airway responses in sheep**. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 97-104.
3. Alessio D'Alessio, Rafia S. Al-Lamki, John R. Bradley and Jordan S. Pober. **Caveolae participate in Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling and Internalization in a Human Endothelial Cell Line**. *Am J of pathology*. 2005; 166 (4):1273-1282
4. Álvarez-Puebla MJ, Olaguibel-Rivera JM, Urbiola-Marcilla E, Garcia BE and Tabar-Purroy AI. **Determinants of allergen-induced late bronchial responses in mild asthmatics**. *Chest*. 2001; 119(1):120-7.
5. Amrani Y., Magnier C., Enouf J., Wuytack F. and Bronner C. **Ca^{2+} increase and Ca^{2+} -influx in human tracheal smooth muscle cells: Role of Ca^{2+} pool controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 isoform**. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1205-1210
6. Babak Razani, Scott E. Woodman and Michael P. Lisanti. **Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology**. *Pharmacological Reviews* 2002; 54:431-467
7. Barnes P.J. **Pharmacology of airway smooth muscle**. *Am J respire crit Care Med*. 1998; 158: s123-132
8. Bazán-Perkins B., V. M. H., Sánchez Guerrero E., Chávez J. and L.M. Montaña. **Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmographi: role of catecholamines and nitric oxide**. *Exp Physiol* 2004; 89: 623-628.
9. Bazán-Perkins B., Moreno-Álvarez P. and Sánchez-Guerrero E. **Modified collagen type I aerosols reduced hyperresponsiveness in chronic sensitized guinea pigs** *Proc Am Thoracic Soc* 2006; 3: A345
10. Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Aguilar-Leon D., Alvarez M.D., Ramos-Ramírez P. and Hernández-Pando R. **Impairment of airway function and development of subepithelial remodeling in sensitized guinea pigs**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007a 175: A161.

11. Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Aguilar-León D., Ramos-Ramírez P., Álvarez-Santos M.D., Gaxiola M., Hernández-Pando R. and Hiriart G. **Alteraciones en la función respiratoria durante el desarrollo de la remodelación de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** *Neumol. Cirugía Tórax* 2007b; 66 :9-10
12. Bing-Hao Luo, Christopher V. Carman, and Timothy A. Springer. **Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling.** *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 619-647
13. Bossé Y., Charles Thompson, Jana Stankova and Marek Rola-Pleszczynski. **Fibroblast Growth Factor 2 and Transforming Growth Factor β -1 Sinergism in human Bronchial Smooth Muscle Cell Proliferation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 746-753.
14. Boudreau, J. P. L. a. N. J. **Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come.** *Biochem J* 1999; 339: 481-488.
15. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Jonson M. and Vingola AM. **Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1720-45
16. Broadley and Toead. **Early and late bronchoconstrictions, airway hyper-reactivity, leucocyte influx and lung histamine and nitric oxide after inhaled antigen: effects of dexamethasone and rolipram.** *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 91-102
17. Campos MG, T. E., Tortoriello J, Oropeza MV, Ponce H, Vargas MH. and Montaña LM. **Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD₄-induced contraction in guinea pig airways.** *Ethnopharmacol* 2001; 74: 7-15.
18. Carafoli E. and Stauffer T. **The plasma membrane calcium pump: Functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression.** *J Neurobiol* 1994; 25: 312-324
19. Carbajal V, Mario H. Vargas. Edgar Flores-Soto, Erasmo Martínez-Cordero, Blanca Bazán-Perkins and Luis M. Montaña. **LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of Sr-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L84-L92
20. Challis R. A., Adams D., Mistry R. and Boyle J. P. **Second messenger and ionic modulation and agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle.** *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 1138-1145

21. Cinton R. **Smooth muscle contraction and relaxation.** *Advan Physiol Educ* 2003; 27: 201-203
22. Cockcroft D. W., F.R.C.P., Davis B. E. **Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen.** *J of Asthma* 2006; 43: 175-178
23. Custovic A. and Murray CS. **The effect of allergen exposure in early childhood on the development of atopy.** *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002; 2(5):417-23.
24. Dahm L.M. and Bowers C.W. **Vitronectin regulates smooth muscle contractility via alpha V and beta 1 integrin.** *J Cell Sci* 1998; 111: 1175-83.
25. De Marco PhD, Marcon MS, et al. **Prognostic factors of asthma severity: A 9 year international prospective cohort study.** *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:1249-1256.
26. Deng JT, S. C., Brautigan DL, Eto M, Walsh MP. **Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase.** *Biochem J* 2002, 367:517-524.
27. Doucet C, B.-B. D., Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. **Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma.** *J Clin Invest* 1998; 101: 2129-2139.
28. Durham S. R. and Kay A. B. **Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions.** *Clinical Allergy* 1985; 15: 411-418
29. Gosens R., Stelmack G., Dueck G., McNeill D., Yamasaki A., Gerthoffer T., Unruh H., Gounni S., Zaagsma J. and Halayko J. **Role of Caveolin-1 in p-42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L523-L534
30. Grunstein MM, Hakonarson H, Leiter J, Chen M, Whelan R, Grunstein JS and Chuang S. **IL-13-dependent autocrine-signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L520-L528
31. Gurjit K. Khurana Hershey, MD, PhD **IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web.** *J Allergy Clin Immunol* 2003; 4: 677-690
32. Halayko A., Tran T. y Goznes R. **Phenotype and Functional Plasticity of Airway Smooth muscle. Role of caveole and caveolins.** *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5: 80-88

33. Hamelmann E, S. J., Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG. and Gelfand EW. **Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 766-775.
34. Hannigan GE, L.-H. C., Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC and Dedhar S. **Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase.** *Nature* 1996; 379: 91-96.
35. Hogg C James. **Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease.** *The lancet* 2004; 364: 709-21
36. Hynes O. Richard. **Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines.** *Cell* 2002; 110: 673-687
37. Ihre E, Axelsson IG. and Zetterstrom O. **Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen.** *Clin Allergy.* 1988; 18(6):557-67.
38. Janssen I. J. and Sims S. M. **Histamine activates Cl⁻ and K⁺ currents in guinea pig tracheal myocytes: Convergence with muscarinic signaling pathway.** *J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1993; 465: 661-677
39. Jones MG. **Exposure-response in occupational allergy.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8 (2): 110-4
40. Khalil N., Amanda Coutts, Gang Chen, Newman Stephens, Stuart Hirst, Deborah Douglas and Thomas Eichholtz. **Release of biologically active TGF- β from airway smooth muscle cells induces autocrine synthesis of collagen.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L999-L1008
41. Kotlikoff M. I., Muray R. K. and Reynolds E.E. **Histamine induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells** *Am J Physiol Cell Physiol* 1987; 253: C561-C566
42. Le Saux CJ, Teeters K, Mivasato SK, Hoffmann PR, Bollt O, Donet V, Shohet RV, Broide DH and Tam EK. **Down regulation of caveolin-1, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, in acute allergen-induced airway remodeling.** *The J of biological chemistry.* 2008; 283(9): 5760-5768.
43. Leff R., Hamann J. and Wegner D. **Inflammation and cell-cell interactions in airway hyperresponsiveness.** *Am Physiol Soc* 1991: L189-L206.
44. Liu S., C. D. A. a. M. H. G. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000; 113: 3563-3571.

45. Liu S., Xu S.W., Kennedy L., Pala D., Chen Y., Eastwood M., Carter D.E., Black C.M., Abraham D.J. and Leask A. **FAK is required for TGF beta-induced JNK phosphorylation in fibroblast: implications for acquisition of a matrix-remodelling phenotype.** *Mol Biol cell* 2007; 18(6):2169-78
46. Machado L, Stalenheim G and Malmberg P. **Early and late allergic bronchial reactions: physiological characteristics.** *Clin Allergy.* 1986; 16(2): 111-7
47. Maguire J.E. Danahey K.M., B. L. C. a. G. A. v. S. **T Cell receptor and b1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125 FAK) in human T cells.** *J Exp Med* 1995; 182: 2079-2090.
48. Makinde T., M. R. F. a. D. K. A. **The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma.** *Immunol Cell Biol* 2007; 85:348-356
49. Mukhopadhyay S., Hoidal R and Mukherjee K. **Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology.** *Respiratory research* 2006; 7: 125.
50. Moreno-Álvarez P., Sánchez-Guerrero E; Gaxiola M., Aguilar D., Montaña L. M. and Bazán-Perkins. **Polimerized collagen reduced neutrophilia and TNF- α expression in chronic sensitized guinea pigs.** *Eur Respir J* 2003; 22 Suppl 45:105s
51. Nguyen, T. T., Ward J.P. and S.J. Hirst. **b1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 114: 2553-2560.
52. O'Byrne, M. D. I. a. P. M. 2003. Airway hyperresponsiveness. *Chest* 123:411S-416S.
53. Peng Q., L. D., Nguyen T.T., Chan V., Matsuda T. and S.J. Hirst. **b1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen.** *J Immunol* 2005; 174: 2258-2264.
54. Picado C. **Early and late-phase asthmatic reactions: a hypothesis.** *Allergy.* 1992; 47(4 Pt 1):331-3.
55. Ramos-Ramirez P., Sanchez-Guerrero E., Alvarez-Santos M., Martinez-Cordero E., Hernandez-Pando R., Vargas-Becerra M.H. and Bazán-Perkins B. **Overexpression of a free β 1-Integrin-like molecule in a experimental model of chronic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: A497.
56. Rodger I. **Excitation-contraction coupling and uncoupling I airway smooth muscle.** *Br. J Clin Pharmacol.* 1985; 20:255S-266S

57. Roux Etienne and Marhl Marko. **Role of Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria in Ca²⁺ Removal in Airway Myocytes.** *Biophysical Journal* 2004; 86: 2583-2595
58. Salanueva I., Cerezo A., Guadamilas M. and del Pozo M. **Integrin regulation of caveolin function.** *J. Cell Mol. Med.* 2007; 11: 969-980
59. Scaffidi A.K., Moodley Y.P., Weichseulbam M., Thompson PJ. and Knight DA. **Regulation of human lung fibroblast phenotype in function by vitronectin and vitronectin integrins.** *J Cell Sci* 2001; 114(19): 3507-16
60. Scherberich A., Moog S., Haan-Archipoff G., Azorsa D.O., Lanza F. and Beretz A. **Tetraspanin CD9 is associated with very late-acting integrins in human vascular smooth muscle cells and modulates collagen matrix reorganization.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(11): 1691-7
61. Shore S. **Airway smooth muscle: new tricks for an old dog.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L518-L519
62. Slade, MD and Kraft, MD. **Airway Remodeling from Bench to Bedside: Current Perspectives.** *Clin chest Med* 2006; 27:71-85
63. Smith N. and Broadley K. **Optimization of the sensitization conditions for an ovalbumin challenge model of asthma.** *International Immunopharmacology* 2007; 7: 183-190
64. Stalenhheim G. and Machado L. **Late allergic bronchial reactions and the effect of allergen provocation on the complement system.** *J allergy Clin Immunol.* 1985; 75(4): 508-12
65. **The Global Burden of Asthma Report. GINA 205. Página electrónica:** www.ginasthma.org
66. Thorsson G., Kristoffer Larsen, Johan M., Marie Wildt, Camilla D., Lennart Hansson, Marko-Varga., Leif Bjermer and Agneta Scheja. **Functional and phenotypical comparison of myofibroblasts derived from biopsies and bronchoalveolar lavage in mild asthma and scleroderma.** *Respiratory research* 2006; 7: 11
67. Tliba Omar, Yassine Amrani and Panettieri. **Is airway smooth muscle the “missing link” modulating airway inflammation in asthma?** *Chest.* 2008; 133: 236-242
68. Tribe M, Patrick Moriarty, Annette Dalrymple, Abdul A. Hassoni and Lucilla Poston. **Interleukin-1 β induces calcium transients and enhances basal and store**

- operated calcium entry in human myometrial smooth muscle.** *Biology of reproduction.* 2003; 68: 1842-1849
69. Tong X.K. and Hamel E. **Transforming growth factor-beta 1 impair endothelin-1-mediated contraction of brain vessels by inducing mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 and inhibiting p38 MAP kinase.** *Mol Pharmacol* 2007; 72 (6): 1476-83.
70. Van der Flier A, S. A. **Function and interactions of integrins.** *Cell Tissue Res* 2001; 305:285-298.
71. Vargas MH. (2005) **Patogenia del asma. En: Asma. Enfoque integral para Latinoamérica.** México: McGraw-Hill Interamericana.
72. Ville CA. **Biología** 8a edición. McGraw-Hill Interamericana editores, México 1996, 943pp
73. Vignola A.M., M. F., Costanzo G., Di Giorgi R., Gjomarkaf M., Bellia V. and G. Bonsignore. **Airway Remodeling in asthma.** *Chest* 2003; 123:417S-422S.
74. West, JB. **Fisiología respiratoria**, 6ª edición. Editorial Medica Panamericana, Argentina 2002, pp: 192.
75. Wills-Karp M., Jackie Luyimbazi, Xueying Xu, Brian Schofield, Tamlyn Y. Neben, Christopher L. Karp and Debra D. Donaldson. **Interleukin-13: central mediator of allergic asthma.** *Science* 1998; 282: 2258
76. Wilson J.W., T. L. B. **Assesing the evidence for remodeling of the airway in asthma.** *Pulm Pharmacol & Ther.* 2001; 14:229-247.
77. Wilson S., Elnekave E., Mentink-Kane, Hodges G., Pesce T., Ramalingam R., Thompson W., Kamanaka M., Flavell A., Keane-Myers, Cheever W. and Wynn A. **IL-13 α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway hyperreactivity and fibrosis in mice.** *J of Clinical Investigation* 2007; 117 (10): 2941- 2951
78. Wipff P.J., Rifkin D.B., Meister J.J. and Hinz B. **Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix.** *J Cell Biol* 2007; 179(6): 1311-23
79. Xiao Q, Z. L., Zhang Z, Hu Y. and Xu Q. **Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin α 1/ β 1/ α v and PDGF receptor pathways.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C342-C352.

80. Yee K.O., Rooney M.M., Giachelli C.M., Lord S.T. and Schwartz S.M. **Role of beta 1 and beta 3 integrins in human smooth muscle cell adhesion to and contraction of fibrin clots in vitro.** *Circ Res* 1998; 83(3): 241-51
81. Ying S., Z. G., Gu S. and J. Zhao. **How much do we know about atopic asthma: where are we now?** *Cell and Mol Immunol* 2006; 3:321-332
82. Zamir Eli and Geiger B. **Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.** *J of Cell Science* 2001; 114: 3583-3590
83. Zang W and Gunst J. **Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix. Implications for contraction.** *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 32-39