



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Expresión de receptores del músculo liso de las vías aéreas relacionados con el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma en *Cavia porcellus*

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Germán Fernando Gutiérrez Aguilar

TUTORA:

Dra: BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS



MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

Formato	Ejemplo
1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Gutiérrez Aguilar Germán Fernando 58 38 72 92 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 303164568
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr Blanca Margarita Bazán Perkins
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 M en C Enrique Moreno Saenz
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Dr Ricardo Lascurain Ledesma
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Biol Mayra Dinorah Álvarez Santos
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Dr María de Lourdes Segura Váldez
7. Datos del trabajo escrito. Título Subtítulo Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito Expresión de receptores del músculo liso de las vías aéreas relacionados con el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma en <i>Cavia porcellus</i> 35 p 2010

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. Enrique Moreno Saenz

Vocal: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Secretario: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

1er. Suplente: Biól. Mayra Dinorah Álvarez Santos

2do. Suplente: Dra. María de Lourdes Segura Váldez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

ASESORA

DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS

SUSTENTANTE

GERMÁN FERNANDO GUTIÉRREZ AGUILAR



Este trabajo se realizó en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, de la Secretaría de Salud bajo la asesoría de la Dra. Blanca Bazán Perkins, y con el apoyo de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales mediante el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (Probei)

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
LAS VÍAS AÉREAS.....	7
ASMA.....	8
CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.....	9
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	9
MEDIADORES INVOLUCRADOS EN LA HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	11
HISTAMINA.....	11
LEUCOTRIENOS.....	12
INTEGRINAS.....	13
FACTOR β 1 DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE....	15
JUSTIFICACIÓN	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
ANIMALES.....	18
SENSIBILIZACIÓN.....	18
PLETISMOGRAFÍA	19
REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	22
DISGREGACIÓN CELULAR.....	22
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS	33

Resumen

Los alvéolos pulmonares son estructuras altamente especializadas que permiten el intercambio gaseoso del aire ambiental con los eritrocitos en los capilares pulmonares, mediante una serie de conductos conocidos como vías aéreas. Las vías aéreas constan de muchos componentes que logran una eficiente respiración, además de ser capaces de neutralizar los agentes nocivos del medio ambiente. Por ello existen numerosas patologías asociadas a las vías aéreas, y de éstas la más común es el asma.

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por presentar obstrucción e inestabilidad de las vías aéreas debido a que las respuestas celulares de las estructuras que la conforman se encuentran alteradas. Esta inestabilidad induce que las vías aéreas sean muy reactivas (hiperreactivas) a cualquier estímulo, tanto físico como químico. Aunque una estructura central en el desarrollo de hiperreactividad es el músculo liso de las vías aéreas, poco se sabe de las características de este tejido en los individuos que desarrollan hiperreactividad de la vía aérea. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de receptores del músculo liso de las vías aéreas relacionados con el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma alérgica en el cobayo (*Cavia porcellus*). Se sensibilizaron al antígeno (ovoalbúmina, OVA) cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH ($n=16$) y se retaron con el antígeno cada 10 días. En el tercer reto antigénico se evaluó la reactividad a la histamina *in vivo*, mientras que la evaluación *in vitro* de la expresión de los receptores a histamina tipo 1 (H1R), leucotrienos (Cys-LT1) y componentes de la matriz extracelular (subunidad β 1 de integrina) así como del factor β de crecimiento transformante (TGF- β) fue realizada 24 horas después mediante citometría de flujo. Se incluyó un grupo control de cobayos a los que sólo se les retó con solución salina fisiológica ($n=6$). En cada reto antigénico se evaluó el cambio en el índice de broncoobstrucción (íB) mediante pletismografía barométrica.

La dosis provocativa de histamina 200 (PD₂₀₀), es decir aquella dosis que hizo triplicar el valor basal del íB no fue diferente de la PD₂₀₀ obtenida después del reto con OVA en los animales controles. La relación PD₂₀₀ basal/PD₂₀₀ post-reto, que representa el grado de reactividad de las vías aéreas, fue cercana a 1 en este grupo control ($n = 6$). No obstante, en los cobayos sensibilizados con el antígeno la relación PD₂₀₀ basal/PD₂₀₀ post-reto fue mayor a 1, por lo que el grado de reactividad fue mayor (hiperreactividad) y significativamente diferente a la del grupo control ($P < 0.05$). En los cobayos sensibilizados con el alérgeno no se observaron cambios en la expresión del receptor Cys-LT1 y de la subunidad β 1 de integrina con relación al grupo control. No obstante, se observó un incremento significativo tanto de la expresión del H1R así como de TGF- β 1 en los cobayos sensibilizados con el alérgeno en relación con el grupo control ($P < 0.01$ y $P < 0.0001$, respectivamente). La magnitud de la hiperreactividad correlacionó significativamente con la expresión del H1R y el TGF- β 1 ($P < 0.05$).

En conclusión, en el músculo liso de las vías aéreas hay un fenotipo asociado a la hiperreactividad de las vías aéreas caracterizado por el incremento en la expresión del H1R y el TGF- β 1 en el músculo liso de las vías aéreas.

Abreviaturas

O₂	Oxígeno
CO₂	Dióxido de carbono
IgE	Inmunoglobulina E
Ca²⁺	Ión calcio
FEV	Volumen de Fuerza Espiratoria
H1R	Receptor de histamina tipo 1
LT	Leucotrieno
Cys-LT1	Receptor de leucotrienos tipo 1
CD29	Subunidad β 1 de integrina
TGF-β	Factor β de crecimiento transformante
PD₂₀₀	Dosis provocativa 200
MEC	Matriz extracelular
OVA	Ovoalbúmina
SSF	Solución salina fisiológica
ÍB	Índice de Broncoobstrucción

Introducción

Las vías aéreas

La respiración celular es una función crucial para los seres aerobios debido a que permite que se obtenga la energía necesaria para el mantenimiento de los procesos metabólicos (Estrada, 2002). Como requerimiento primordial, la respiración celular necesita de un aporte continuo de O_2 así como de la eliminación de CO_2 . En los individuos aerobios unicelulares, la difusión de estos gases ambientales ocurre directamente del medio ambiente, pero los seres aerobios multicelulares requieren de sistemas de intercambio y distribución de gases como el cutáneo, traqueal, branquial y pulmonar (Estrada, 2002).

En los mamíferos, las estructuras encargadas de llevar a cabo el intercambio gaseoso son los alvéolos pulmonares (Ville, 1996). No obstante, debido a su ubicación en el organismo, los alvéolos pulmonares no pueden intercambiar directamente el aire ambiental, por lo que se necesita conducirlo, filtrarlo, calentarlo y humedecerlo en estructuras conocidas como vías aéreas (West, 2002). Las vías aéreas se dividen en superior, central e inferior. La superior está formada por las fosas nasales, faringe y laringe, la central es la tráquea y la inferior está conformada por tubos ramificados, que se vuelven más estrechos cortos y numerosos conforme penetran en el pulmón y cuyo destino es uno de los millones de sacos alveolares del pulmón (Ville, 1996; West, 2002).

Estructuralmente, las vías aéreas constan de un epitelio pseudoestratificado ciliado, que reduce su espesor conforme disminuye el calibre de la vía aérea. Bajo este epitelio se encuentra una membrana basal, tejido conjuntivo laxo, músculo liso y estructuras cartilagosas. Las estructuras cartilagosas se pueden observar en tráquea y bronquios, pero las vías aéreas inferiores como los bronquiolos carecen de cartílago (Estrada, 2002). En conjunto, las vías aéreas constan de muchos componentes cuya función es lograr una eficiente respiración, neutralizando los agentes nocivos del medio ambiente, por lo que cada uno de los componentes se relaciona con los demás. De este modo una alteración en cualquier nivel puede desencadenar algún desorden, existen numerosas patologías asociadas a las vías aéreas, y de éstas la más común es el asma.

Asma

El asma es una enfermedad caracterizada por presentar inflamación, hiperreactividad y obstrucción de las vías aéreas, que se manifiesta por episodios recurrentes de sibilancias, disnea, hundimiento del pecho y tos, especialmente por la noche o madrugadas. Estos episodios están relacionados usualmente con una obstrucción generalizada pero variable del flujo de aire que a menudo es reversible ya sea de manera espontánea o con tratamiento (GINA, 2008).

Aunque el asma es referido continuamente como una manifestación de alergia, en muchos asmáticos el factor desencadenante del asma no está asociado con alergenios. El asma no-alérgica, conocida también como intrínseca, es menos frecuente que la alérgica o extrínseca. Paradójicamente, ambos tipos de asma son clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similares (Vargas, 2005).

El asma extrínseca es la más caracterizada. El factor desencadenante de este tipo de asma es la exposición a alergenios en individuos atópicos (que presentan altos niveles de inmunoglobulina E, IgE). El asma en estos individuos se inicia cuando el alergenio llega a las mucosas donde es endocitado y procesado por células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas. Los fragmentos degradados del alergenio son presentados a los linfocitos T maduros vírgenes, que entonces interactúan con los linfocitos B para producir inmunoglobulina E (IgE) específica para el alergenio. La sensibilización al alergenio se produce cuando la IgE se une a su receptor de alta afinidad, FcεRI que se encuentra en mastocitos, eosinófilos y basófilos. Aunque continuamente se produce IgE ante la presencia de alergenios, algunos individuos la producen en exceso, condición conocida como atopia (Ying *et al*, 2006). La expresión del asma en los individuos atópicos es un evento que se inicia cuando aparece de nuevo el alergenio y es reconocido por la IgE que se encuentra unida al receptor FcεRI de la célula sensibilizada. Esto desencadena la liberación masiva de mediadores pro-inflamatorios así como de moléculas que producen la contracción del músculo liso de las vías aéreas (Bazán-Perkins *et al*, 2008).

Contracción del músculo liso de las vías aéreas

La contracción del músculo liso de las vías aéreas sucede cuando agonistas como la histamina y los leucotrienos, que son liberados principalmente por los mastocitos, inducen el incremento del Ca^{2+} intracelular. Este incremento de Ca^{2+} estimula 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 de la cadena ligera de miosina en la serina 19. Esta fosforilación produce una cadena de eventos que inician con la activación de la adenosintrifosfatasa de miosina, facilitando la interacción de los filamentos de actina y miosina, iniciando el desarrollo de tensión muscular (Giembycz y Raeburn, 1992; Rodger, 1985). Cuando el Ca^{2+} regresa a sus niveles basales, la cinasa de la cadena ligera de miosina se inactiva, la miosina se desfosforila y el músculo se relaja.

Hiperreactividad de las vías aéreas

La respuesta celular alterada producida por la inflamación durante el asma provoca que las estructuras de las vías aéreas, incluyendo al músculo liso, se vuelvan inestables. A este fenómeno se le conoce como hiperreactividad y se caracteriza porque el calibre de las vías aéreas se reduce mucho más fácil y más rápido ante estímulos endógenos o exógenos (Bazán-Perkins *et al*, 2008).

La hiperreactividad de las vías aéreas se puede determinar al administrar agonistas que induzca contracción del músculo liso de las vías aéreas y evaluando la curva dosis-respuesta (Fig. 1).

En la actualidad se ignoran los procesos involucrados en la génesis de la hiperreactividad, sin embargo se han podido diferenciar dos componentes que tienen mecanismos completamente distintos. El primero es la hiperreactividad transitoria que se presenta después de la exposición a un alérgeno y que está relacionada con el proceso inflamatorio. El segundo componente es la hiperreactividad persistente, que se ha asociado con cambios estructurales de las vías aéreas inducidos por la inflamación crónica, proceso conocido como remodelación de las vías aéreas (Crockcroft *et al*, 2006).

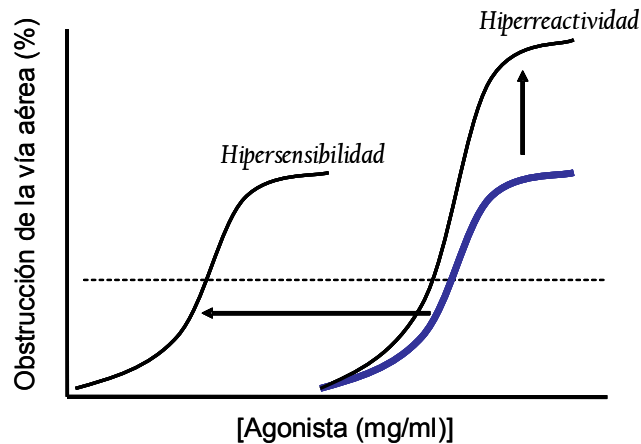


Figura 1. **Determinación del grado de reactividad de las vías aéreas.** En el eje de las Y se muestra la magnitud de obstrucción en porcentaje (calibre) de las vías aéreas, mientras que las X la concentración del agonista en mg/ml (usualmente histamina o acetilcolina). La curva típica de un individuo normal se muestra en azul. La hiperreactividad incluye un corrimiento a la derecha de la curva dosis respuesta (hipersensibilidad), así como el aumento en la pendiente y en la respuesta máxima al agonista (hiperreactividad) (Modificado de Leigh *et al*, 2002).

Aunque la hiperreactividad es una característica distintiva del asma, se presenta también en enfermedades pulmonares crónicas obstructivas, fibrosis quística, displasia broncopulmonar o rinitis alérgica. Incluso puede aparecer un tipo de hiperreactividad transitoria en el transcurso de un catarro común, tabaquismo o inhalación de gases tóxicos (Vargas, 2005).

En el asma, la hiperreactividad se caracteriza por ser más exacerbada que en otras patologías y es de hecho la alteración fisiopatológica más importante del asma, pues se sabe que el grado de hiperreactividad está asociado a la gravedad del asma (O`Byrne, 2003; Fig. 2).

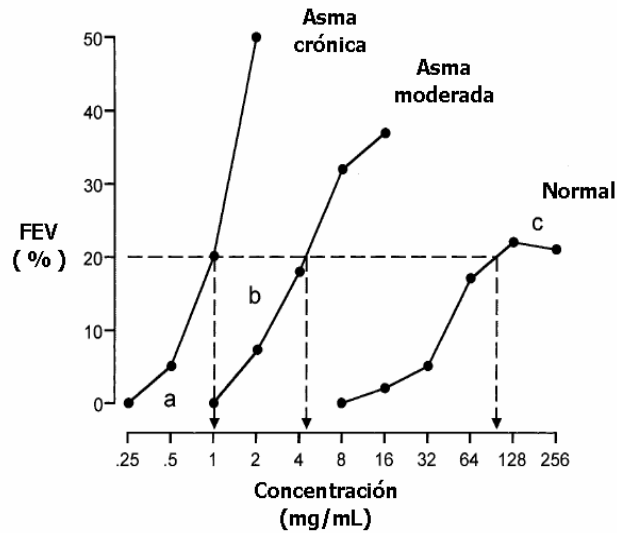


Figura 2. **Severidad del asma y grado de hiperreactividad.** Curva dosis-respuesta donde se observa la caída del volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV) a diferentes concentraciones del agonista que induce contracción del músculo liso (O'Byrne, 2003).

Mediadores involucrados en la hiperreactividad de las vías aéreas

Histamina

La histamina es un autacoide (2-(4-imidazolyl) etilamina) que se forma en el organismo por la descarboxilación de la L-histidina mediante la enzima L-histidinodescarboxilasa. Se sintetiza y se libera en los mastocitos, basófilos y otras células de la mucosa de las vías aéreas (Shirasaki, 2008).

Existen 3 subtipos de receptores a histamina, H1R, H2R y H3R. En particular, el H1R se encuentra en el músculo liso de las vías aéreas, donde la histamina es un agonista para su contracción (Barnes, 1998). Cuenta con 7 cadenas transmembranales y está acoplado a una proteína G trimérica. Cuando la histamina interactúa con su receptor además de inducir la contracción del músculo liso, incrementa la permeabilidad vascular, liberación de mediadores inflamatorios, prostaglandinas e induce la secreción de moco (Montes *et al*, 2005).

En la mucosa nasal de cobayos, se ha descrito que la sensibilización con alérgeno (DNP-*Ascaris*) induce el incremento del número de H1R, y se ha sugerido que este incremento pueda ser la causa de la hiperreactividad nasal (Ohkawa *et al*, 1999).

Adicionalmente, los ratones deficientes de H1R (H1R^{-/-}), no desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas (Bryce *et al*, 2006). No obstante, hasta la fecha se ignora si la expresión de H1R podría estar asociada con la magnitud de la hiperreactividad de las vías aéreas.

Leucotrienos

Los leucotrienos (LT; “leuko” de leucocito y “trieno” que tiene tres enlaces dobles conjugados) son producto de la vía 5-lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico (Sacre, 2008). Los LT tienen receptores específicos Hepta-helicales de la clase rodopsina localizados en la membrana plasmática exterior de células estructurales e inflamatorias. La interacción de los LT con su receptor induce la activación de proteínas G triméricas que inducen el incremento de Ca²⁺ intracelular y disminuyen la producción de AMPc. Estas señales activan cinasas y estimulan diferentes funciones celulares, desde la motilidad, hasta la activación transcripcional (Peters-Golden, 2007; Shirasaki, 2008). Los LT son de suma importancia en la señalización en una gran variedad de tipos celulares (tabla 1).

Células	Capacidad relativa de síntesis		Expresión de receptores	
	Cisteinil leucotrienos		CysLT-1	
Neutrófilos	-		±	
Macrófagos o monocitos	++		+	
Eosinófilos	+++		+	
Basófilos	+++		+	
Mastocitos	+++		+	
Linfocitos B	-		+	
Linfocitos CD4	-		+	
Linfocitos CD8	-		ND	
Células dendríticas	+		+	
Células progenitoras hematopoyéticas	-		+	

(+) Síntesis; (-) sin síntesis; (±) Síntesis baja; (ND) sin determinar. (Modificado de Peters-Golden M, Henderson WR).¹

Tabla 1. Principales fuentes celulares de leucotrienos. Se muestra la presencia/ausencia de leucotrienos en diferentes tipos celulares, resaltando la expresión del receptor Cys-LT1 (Modificado de Peter-Golden, 2007).

Un grupo importante de LT son los cisteinil-LT, como el C₄, D₄, y E₄ que se unen al mismo receptor, el Cys-LT1. La activación del receptor Cys-LT1 está involucrada en la regulación de la broncoconstricción, secreción de moco, edema e hiperreactividad de las vías aéreas (Peters-Golden, 2007; Shirasaki, 2008; Carbajal *et al*, 2005).

Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas transmembranales de adhesión celular que “integran” información en ambos sentidos de la membrana plasmática. El dominio extracelular de las integrinas tipo 1 es usualmente muy grande y funciona como receptor de componentes de la matriz extracelular. Entre los ligandos de las integrinas se encuentran la colágena, la fibronectina, la vitronectina y la laminina. Por su parte, el dominio intracelular de las integrinas (también tipo 1) es pequeño e interactúa con los microfilamentos del citoesqueleto mediante proteínas como la talina, la α -actinina, la filamina y la cinasa ligada a integrina (ILK). Debido a que las integrinas no tienen actividad enzimática, es mediante estas proteínas citosólicas que activan cascadas de señalización celular involucradas en la contracción, movilización, secreción y endocitosis, entre otras funciones celulares (Barczyk *et al*, 2010).

Las integrinas son heterodímeros formados por dos subunidades glicoproteicas α y β , unidas en forma no covalente. Hasta el momento se conocen 8 tipos de subunidades β y 18 tipos de subunidad α , y al combinarse generan las 24 integrinas hasta ahora conocidas (Barczyk *et al* 2010).

Particularmente, la subunidad β 1 de integrina (CD29) tiene la peculiaridad de asociarse con al menos 12 de las 18 subunidades α de integrina (de α 1 a α 11 y α v). Funcionalmente la subunidad β 1 de integrina tiene un papel muy importante en procesos de adhesión, migración, proliferación, secreción y diferenciación en muchos tipos celulares (Peng *et al*, 2005; Nguyen *et al*, 2005 y Xiao *et al*, 2007). En las vías aéreas la subunidad β 1 es expresada en músculo liso, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T (Nguyen *et al*, 2005; Maguire y Danahey, 1995; Doucet *et al*, 1998 y Abraham *et al*, 2004).

Recientemente, en un modelo de asma en el cobayo se observó que la subunidad β 1 de integrina se sobreexpresa en el músculo liso de las vías aéreas, y sorpresivamente

sobre la colágena tipo I y II de la lamina propia, donde además se encontraba en forma libre, esto es, no asociada a células. Adicionalmente, en este estudio se determinó que la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en estas estructuras se asocia con el grado de hiperreactividad de las vías aéreas (Bazán-Perkins *et al*, 2009).

Factor $\beta 1$ de crecimiento transformante

El factor $\beta 1$ de crecimiento transformante (TGF $\beta 1$) es un regulador de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos, los cuales dependen del estado de activación celular, concentración, balance de expresión de otras citocinas y condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúan (Peralta *et al*; 2001). El TGF- $\beta 1$ es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales de placenta y de riñón (Da Cunha y Vitkovic, 1992).

El TGF- $\beta 1$ es un inhibidor de proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide y de varios tipos de células malignas. También puede estimular la proliferación de fibroblastos, de células no epiteliales y de ciertos tipos mesenquimales (Sport y Roberts, 1992). En el caso de los fibroblastos, el TGF $\beta 1$ está involucrado en su diferenciación hacia miofibroblastos. Éstos caracterizados por incrementar la secreción de moléculas de matriz extracelular implicadas en remodelación de las vías aéreas (Thorsson *et al*, 2006). En este sentido, el TGF- $\beta 1$ es un potente estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales. Además es capaz de aumentar la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de la MEC (Peralta *et al*, 2001).

El papel del TGF- $\beta 1$ en la hiperreactividad es muy controversial. Por un lado, en ratones se ha observado que la utilización de anticuerpos neutralizantes de TGF- $\beta 1$ inducen hiperreactividad (Alcorn *et al*, 2007); pero por otro lado, un estudio describe que la presencia de TGF- $\beta 1$ induce hiperreactividad (Kim *et al*, 2005).

Justificación

El asma es una de las enfermedades crónicas tratables más comunes a nivel mundial que, debido a su naturaleza crónica, representa una significativa carga económica. Aunque la hiperreactividad es la característica fisiopatológica más importante del asma, aun se ignora el mecanismo preciso involucrado en su desarrollo. Una estructura central en el desarrollo de hiperreactividad es el músculo liso de las vías aéreas y, recientemente observamos que la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en este músculo se relaciona con la magnitud de la hiperreactividad. No obstante, en ese estudio se observó que la integrina no solo estaba en las células del músculo liso de la vía aérea, sino también de manera libre o acelular. Debido a la importancia fisiológica del músculo liso de las vías aéreas, el presente estudio se enfocó en evaluar el papel de la subunidad $\beta 1$ de integrina asociada a los miocitos. También se ignora si la principal citocina ligada a integrinas, el TGF- $\beta 1$, esta asociada con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el músculo liso de las vías aéreas. Finalmente es importante determinar si se genera un fenotipo de músculo liso relacionado con el desarrollo de la hiperreactividad, en el cual además de evaluar la expresión de integrinas $\beta 1$ y TGF- $\beta 1$, moléculas involucradas en la contracción del músculo liso como el H1R y el receptor Cys-LT1 podrían estar involucradas.

Planteamiento del problema

Se ha descrito un aumento en la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, tanto celular cómo acelular, relacionado con la hiperreactividad en las vías aéreas. En virtud de que el músculo liso es la estructura más importante en el desarrollo de hiperreactividad, es probable que la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina asociada a la membrana de los miocitos, se encuentre aumentada y relacionada con la hiperreactividad en nuestro modelo de asma.

Hipótesis

La hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo está asociada con el aumento en la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en células del músculo liso.

Objetivos

General

Relacionar la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en las células de músculo liso de las vías aéreas con el desarrollo de la hiperreactividad en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Particulares

1. Determinar la hiperreactividad de las vías aéreas en cobayos sensibilizados y retados repetitivamente con ovoalbúmina.
2. Evaluar mediante citometría de flujo la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina así como de moléculas involucradas en la contracción del músculo liso como el H1R, Cys-LT1, y TGF- $\beta 1$ en miocitos traqueales de los cobayos mencionados en el objetivo 1.
3. Relacionar estadísticamente la magnitud de la hiperreactividad con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina así como con el H1R, Cys-LT1 y TGF- $\beta 1$ en miocitos traqueales de los cobayos mencionados en el objetivo 1.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron 22 cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa 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 (Número de proyecto B27-08).

Sensibilización

En el día uno, los cobayos fueron inyectados una vez por vía sistémica con ovoalbúmina (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 30 ml de solución salina fisiológica (SSF; modificado de Campos *et al*, 2001). A los 6 cobayos controles se les administró una inyección con el mismo volumen pero de SSF (Fig. 3).

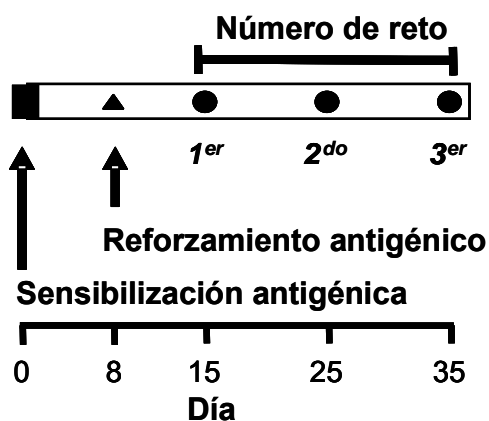


Figura 3. Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos.

Pletismografía

En el día 8 se reforzó la sensibilización de los cobayos con OVA (Fig. 3), colocándolos dentro de una cámara donde se registró el índice de broncoobstrucción (iB) basal con la ayuda de un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento (Fig. 4; Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Posteriormente se les suministraron 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. Posteriormente 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). 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 no incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada período fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. Cada valor del iB fue el promedio de 15 segundos de lecturas y, de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período.

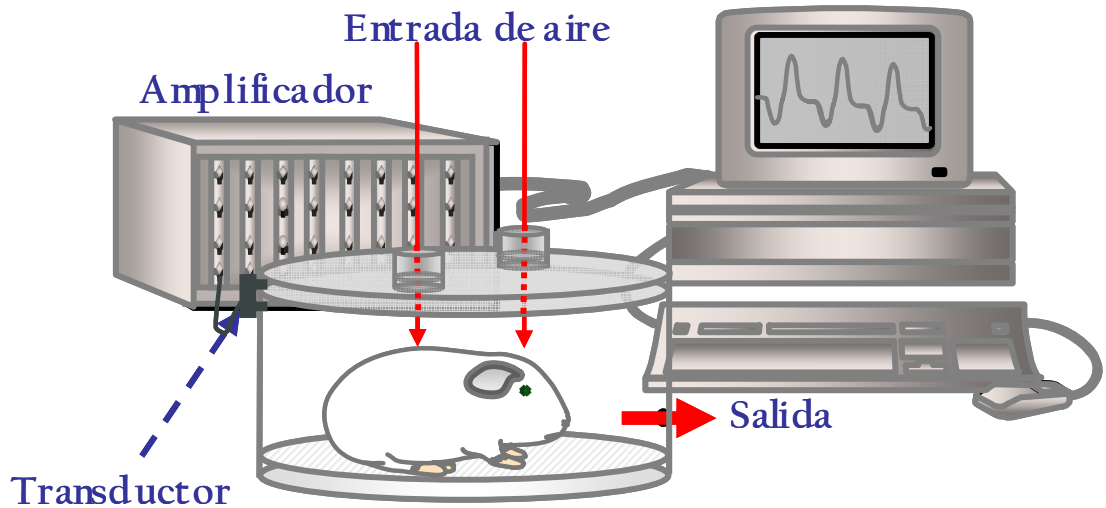


Figura 4. **Esquema del equipo de pletimografía barométrica para animales en libre movimiento.** En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletimografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registra 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.

El \dot{V}_B se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y el que está dentro del pulmón del cobayo, debido a que el aire ambiental se calienta de $\sim 25^\circ\text{C}$ a 37°C una vez que está dentro de los pulmones, además de que también se humidifica al 100%, los sensores de la cámara de pletimografía detectan este cambio en el volumen como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio, 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 dentro de la cámara 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 de la computadora puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración en el equipo previamente calibrado (Fig. 5; Hamelmann *et al*, 1997).

La información es procesada para dar el valor del \dot{V}_B que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\dot{V}_B = [(T_e - T_r) / T_r] [PFE / PFI]$$

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)

Se realizaron tres retos con el antígeno los días 15, 25 y 35, el día 15 con 1mg/ml de OVA y los días 25 y 35 con 0.5 mg/ml (Fig. 4). Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado en todos los casos durante una hora. Los cobayos control recibieron SSF durante los retos.

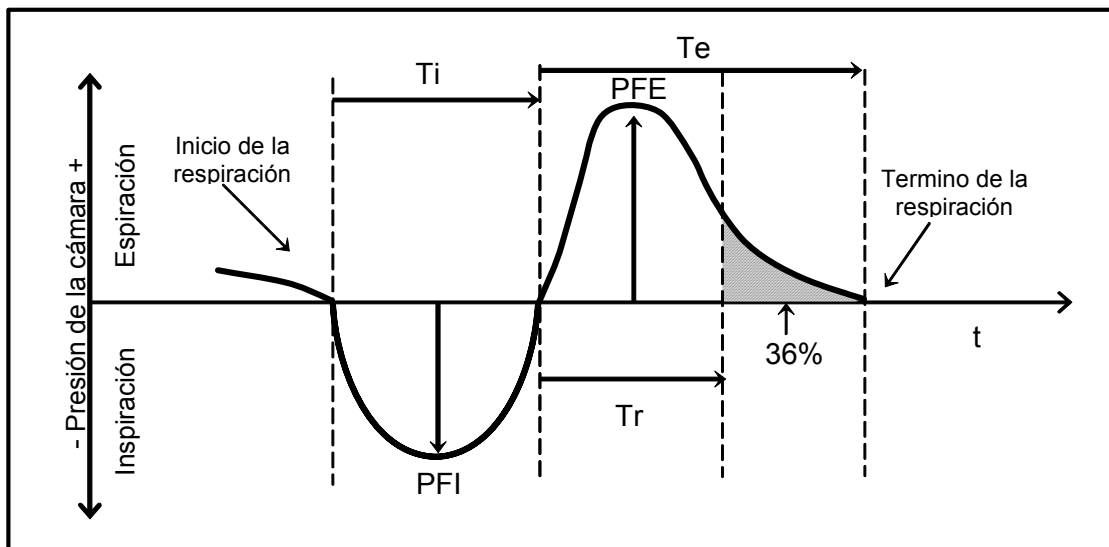


Figura 5. **Esquema de los cambios de presión dentro de la cámara durante la inspiración y la espiración en un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un animal en libre movimiento.** El tiempo inspiratorio (T_i), es el intervalo de tiempo ocurrido desde el inicio de la inspiración 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.

Reactividad en las vías aéreas

La reactividad de las vías aéreas fue evaluada en los grupos controles y en el grupo experimental, en el tercer reto con OVA (día 35), comparando las curvas dosis respuesta a la histamina antes y después de la administración de OVA. Para ello, inicialmente se obtuvo el IB basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma St Louis, EU) durante 1 minuto. Para cada dosis se registró el IB durante 5 minutos continuos y se obtuvo el valor promedio. El intervalo entre la administración de cada dosis fue de 10 min. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una broncoobstrucción que Triplicó el valor basal del IB (Dosis provocativa 200 ó PD₂₀₀). Después se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un IB aproximado al 50% del valor basal (Bazan-Perkins *et al*, 2004), y se retó con aerosoles de OVA (0.5 mg/ mL SSF, 1 minuto). La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva.

Disgregación celular

Veinticuatro horas después de terminada la segunda curva de histamina, a los cobayos se les aplicó eutanasia mediante una sobredosis con pentobarbital sódico. Una vez que los cobayos tuvieron paro cardiorespiratorio, se les realizó una incisión en el cuello para disecar la tráquea. A la tráquea se le eliminó la fascia superficial para seccionarla 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 continua de músculo liso. Esta tira fue incubada en 5 ml de solución Hank's (Gibco, New Cork, EUA) adicionada con 2 mg de cisteína y 0.05 U/ml de papaína durante 10 min a 37°C. Posteriormente el tejido fue lavado con 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 100 µl de Liberasa (Roche, EUA). En solución fresca se llevó a cabo una segunda incubación durante 10 min a 37°C hasta que las células se observaron disgregadas. Se corroboró la disgregación mediante la obtención de alícuotas que se observaron en un microscopio (OLYMPUS, modelo CH30LF100). Una vez disgregadas las células, toda actividad

enzimática fue detenida completamente adicionando solución de Leibovitz (Gibco, New Cork, EUA). Las células disgregadas fueron concentradas mediante dos centrifugaciones a 600 rpm durante 5 min, separadas por un lavado con solución Leibovitz (Gibco, New Cork, EUA).

Citometría de flujo

Las células de músculo liso disgregadas 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), 10 µl de forbol 12-miristato,13-acetato y 5 de ionomicina (Sigma, EUA) por cada millón de células para los grupos experimentales. Se aumentó la permeabilidad de la membrana celular de todas las células mediante la incubación con 1.5 ml de saponina (Sigma, EUA), 0.1%, albúmina sérica de bovino (Sigma, EUA) 10%, HEPES 0.01M (Sigma, EUA) y 100µg/µl de IgG de cerdo disuelto en 100 ml de PBS durante 10 min agitando suavemente a temperatura ambiente. Después se incubaron las células con anticuerpos primarios contra la subunidad β1de integrina (Santa Cruz Biotechnology, EUA), el H1R (Santa CruzBiotechnology, EUA), el Cys-LT1 (Calbiochem, EUA) y el TGF-β1 (SantaCruz Biotechnology, EUA). En todos los casos se utilizó una dilución de 1µl por 1×10^6 células y se incubaron los anticuerpos primarios durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez terminada la incubación, las células se lavaron con 1.5 ml de solución saponina, y 0.1%, HEPES 0.1M disuelto en 300 ml de PBS. Posteriormente las células se incubaron durante 30 min 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, por último, se fijaron con formaldehído al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo (Becton & Dickinson FACScan model Scallibur).

Análisis estadístico

La reactividad de la vía aérea a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% (PD₂₀₀), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el íB basal. Las comparaciones entre dos grupos fueron evaluadas mediante la prueba pareada de t de Student. Para la asociación con la subunidad de integrina β 1 se usó el coeficiente de correlación de Spearman. La significancia estadística se estableció con una $P < 0.05$. Los valores en las figuras son expresados como la media \pm el error estándar.

Resultados

Reactividad de las vías aéreas

La dosis provocativa de histamina 200 (PD_{200}), es decir, aquella dosis que hizo triplicar el valor basal del íB, no fue diferente de la PD_{200} obtenida después del reto con OVA en los controles. La relación PD_{200} basal/ PD_{200} post-reto, que representa el grado de reactividad de las vías aéreas, fue cercana a 1 en este grupo control ($n = 6$, Fig. 6). No obstante, los cobayos sensibilizados (modelo de asma) mostraron una PD_{200} post-reto con OVA menor al PD_{200} basal, por lo que el grado de reactividad fue mayor (hiperreactividad) y significativamente diferente a la del grupo control ($P < 0.05$, $n = 16$; Fig. 6).

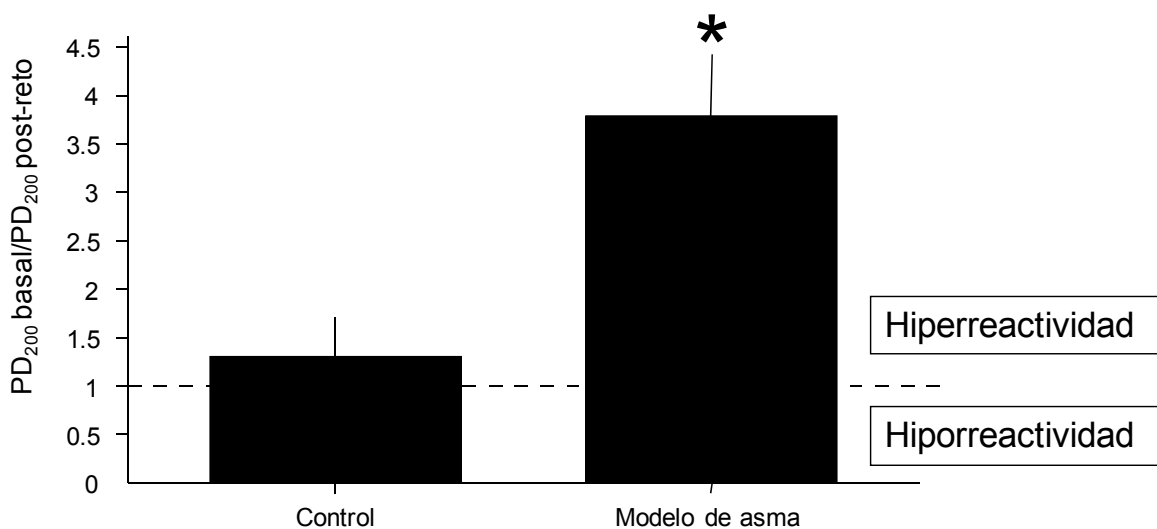


Figura 6. **Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** La gráfica muestran las dosis de histamina requeridas para producir el 200% de incremento del índice de obstrucción basal (PD_{200}). La línea discontinua en el centro de la gráfica señala la frontera entre hiporreactividad e hiperreactividad. * $P < 0.05$ comparado con el control (prueba no-pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

Expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina y el Cys-LT1 en miocitos

Tanto los miocitos que expresaron la subunidad $\beta 1$ de integrina (Fig. 7) como el receptor Cys-LT1 (Fig. 8) aumentaron su número aunque no significativamente en los cobayos del modelo de asma en relación al grupo control ($n = 16$ y 6 , respectivamente).

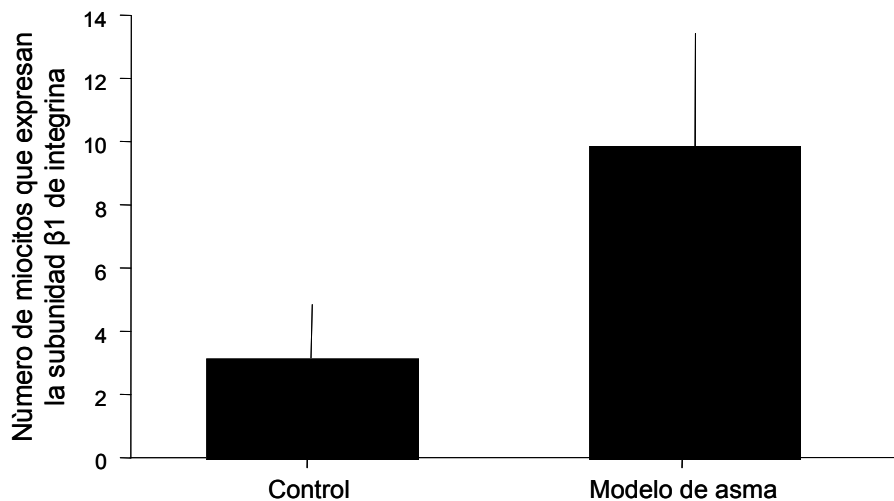


Figura 7. **Expresión de la subunidad β1 en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** Las barras corresponden a promedios ± error estándar.

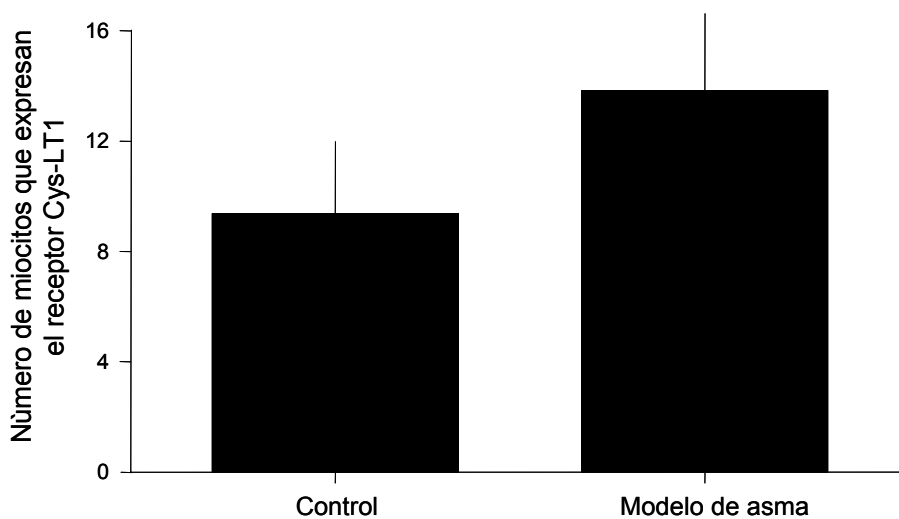


Figura 8. **Expresión del receptor Cys-LT1 en los miocitos traqueales en el modelo de asma alérgica en el cobayo.** Las barras corresponden a promedios ± error estándar.

Expresión del H1R en miocitos

Los miocitos que expresaron el H1R de histamina fueron significativamente mas en los cobayos del modelo de asma en comparación al grupo control ($P < 0.01$; $n= 16$ y 6 , respectivamente; Fig.9).

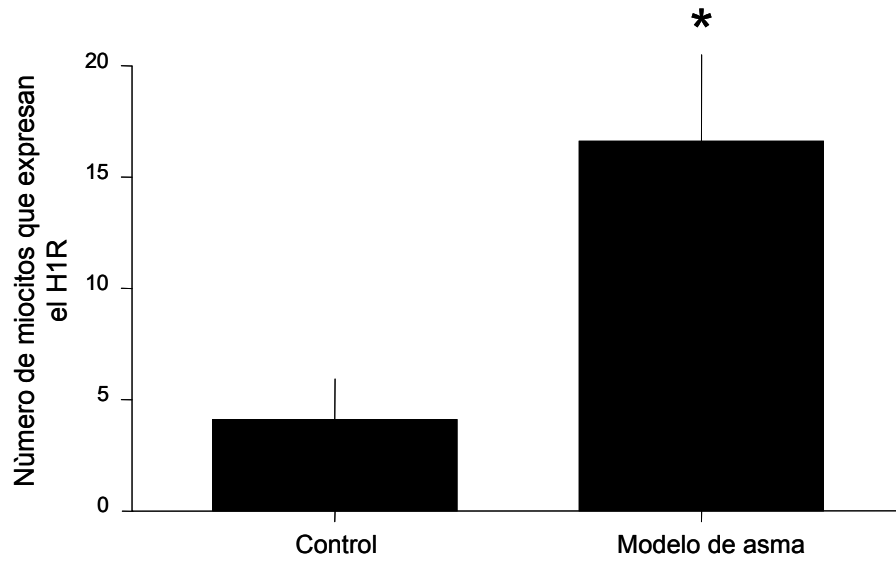


Figura 9. **Expresión del H1R en los miocitos traqueales en el modelo de asma alérgica en el cobayo.** * $P < 0.01$ comparado con el control (prueba no-pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

Expresión de TGF- β 1 en miocitos

Los miocitos que expresaron esta citocina fueron significativamente más en los animales del modelo de asma en comparación con los controles (* $P < 0.001$; $n = 16$ y 6 respectivamente, Fig. 10).

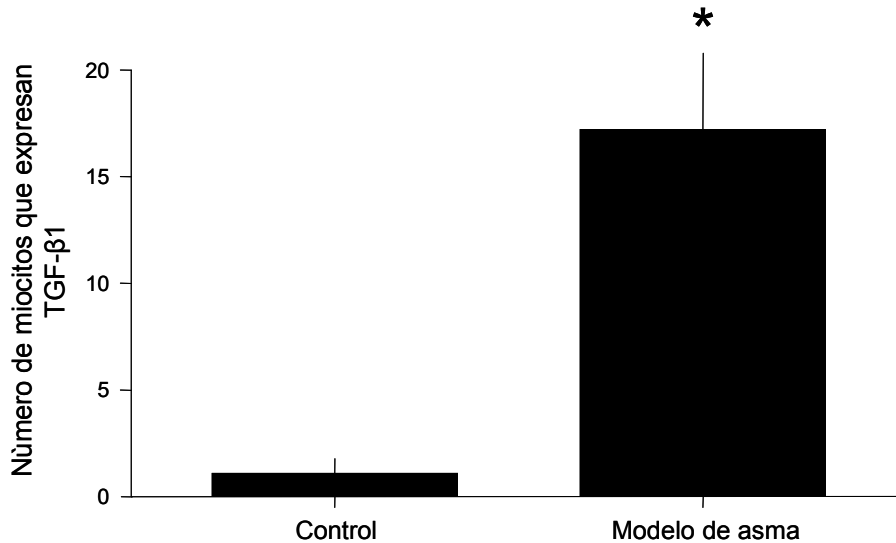


Figura 10. **Expresión de TGF- β 1 en los miocitos traqueales en el modelo de asma alérgica en el cobayo.** * $P < 0.001$ comparado con el control (prueba no-pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

Relación entre la magnitud de la hiperreactividad con la cantidad de miocitos que expresan el receptor Cys-LT1, la subunidad $\beta 1$ de integrina, el H1R y el TGF- $\beta 1$

En la tabla 2 se muestran los coeficientes de correlación de la magnitud de la hiperreactividad de las vías aéreas con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, H1R, Cys-LT1 y el TGF- $\beta 1$ en el miocitos traqueales. La magnitud de la hiperreactividad tuvo una correlación negativa y estadísticamente significativa con la expresión del receptor H1 y el TGF- $\beta 1$ ($P < 0.05$). La correlación de la hiperreactividad y la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina y el receptor de Cys-LT1 fue también negativa pero no presentó diferencias significativas.

Finalmente, el coeficiente de correlación de la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina y el TGF- $\beta 1$ fue de 0.795 ($P < 0.0001$; $n = 22$, tabla 3).

Tabla 2. Coeficientes de correlación de la hiperreactividad con la expresión de de la subunidad $\beta 1$ de integrina, H1R, Cys-LT1 y el TGF- $\beta 1$ en el músculo liso de las vías aéreas.

	Subunidad $\beta 1$ de integrina	Receptor H1	Receptor CysLT-1	TGF $\beta 1$
AHR	-0.317	-0.383*	-0.046	-0.398*

Los valores negativos implican una relación directa con la hiperreactividad, esto es porque los valores de hiperreactividad son obtenidos mediante el cociente de la PD_{200} basal con la PD_{200} post-reto de histamina (basal/postreto). * $P < 0.05$, prueba de t de Student, $n = 26$.

Tabla 3. Coeficiente de correlación entre la subunidad $\beta 1$ de integrina y TGF $\beta 1$

	Subunidad $\beta 1$ de integrina
TGF $\beta 1$	0.795*

El coeficiente de correlación es positivo lo que implica una relación directa. * $P < 0.0001$, prueba de T de Student, $n = 22$.

Discusión

Las vías aéreas son una serie de conductos ramificados cuya función es permitir la ventilación pulmonar. Las vías aéreas son susceptibles de reducir su calibre ante una gran cantidad de estímulos, pero en condiciones patológicas como la hiperreactividad, la reducción del calibre ocurre con más intensidad (Woolcock y Peat, 1989). Muchas enfermedades se caracterizan por presentar hiperreactividad, pero la más común es el asma. Nosotros observamos que la administración del alérgeno en un modelo de asma alérgica en el cobayo induce el desarrollo de hiperreactividad a la histamina.

El músculo liso de las vías aéreas es el principal efector de la hiperreactividad (Hirota *et al*, 2009). Aunque el mecanismo preciso que induce hiperreactividad es desconocido, es muy probable que la inflamación y la remodelación estén involucrados (Hirota *et al*, 2009; Cocroft, 2006). Se sabe sobre la naturaleza de las alteraciones que presenta el músculo liso, pero poco en relación con la hiperreactividad. En el presente estudio se describe que la hiperreactividad de las vías aéreas se relaciona con el número de células musculares traqueales que expresan el receptor de histamina H1R y el TGF- β 1.

La histamina es un importante mediador de una gran cantidad de respuestas fisiopatológicas asociadas al asma. Este autacoide se encuentra preformado en los mastocitos y basófilos, y se libera en presencia del antígeno. Mediante su señalización a través del receptor H1R, la histamina induce la obstrucción de las vías aéreas tanto por contracción del músculo liso como por la inducción de edema e hipersecreción de moco, además de producir tos al activar reflejos del vago (White, 1990). Los bloqueadores del receptor H1R como la loratadina muestran beneficios en pacientes con asma especialmente si se usa en combinación con otras terapias (Twentyman *et al*, 1993; Bentley *et al*, 1996; Roquet, 1997). En este estudio observamos que las células que expresan el receptor H1R aumentó en el músculo liso de las vías aéreas de los cobayos experimentales del modelo de asma, y que este incremento se correlacionó directamente con la magnitud de la hiperreactividad de las vías aéreas. Esto sugiere que la expresión del HR1 en el músculo liso podría tener un papel importante en el desarrollo del asma.

El TGF- β 1 es una proteína multifuncional con importantes funciones inmunoregulatoras en la inflamación (khalil *et al*, 2001). Sin embargo, el papel del TGF- β 1 en el asma es controversial. Por un lado se ha descrito que el TGF- β 1 suprime el desarrollo del asma y de la hiperreactividad (Burchell *et al*, 2009; Alcorn *et al*, 2007), pero por otro también se ha observado que durante el desarrollo del asma y la hiperreactividad hay un incremento en la expresión de TGF- β 1 (Wakahara *et al*, 2008; Ozyilmaz *et al*, 2009). Nosotros observamos un incremento en el número de células que expresan TGF- β 1 en el músculo liso de las vías aéreas del cobayo y que este incremento esta correlacionado directamente con la magnitud de la hiperreactividad. Esto sugiere que el músculo liso probablemente esta desarrollando un fenotipo diferente durante en el del modelo del asma, y que este fenotipo esta asociado con la hiperreactividad de la vía aérea.

Un importante efecto biológico del TGF- β 1 es inducir la expresión de integrinas (Wipff y Linz, 2008; Peralta *et al*, 2001). Entre las integrinas que son activadas por el TGF- β 1 se encuentra la subunidad β 1 (Warstat *et al*, 2010; Fong *et al*, 2009). Aunque en el presente estudio no se observó un incremento en el número de células que expresan la subunidad β 1 de integrina en el modelo de asma como sucedió con el TGF- β 1, si se determinó que hay una asociación estadísticamente significativa en la expresión de ambas proteínas.

Previamente se describió que la expresión de la subunidad β 1 de integrina en el músculo liso de las vías aéreas se relaciona con la magnitud de la hiperreactividad (Bazán-Perkins *et al*, 2009). No obstante, en el presente estudio observamos que el número de células que expresan esta subunidad no se correlaciona con la hiperreactividad. Es probable que la discrepancia entre ambos estudios se deba a la técnica de determinación de la integrina, pues en el estudio de Bazán-Perkins y colaboradores (2009) se utilizó morfometría, que tiene la limitante de no permitir discernir entre la expresión de la integrina de los miocitos y la acelular, mientras que la utilizada en el presente estudio, citometría, determinó exclusivamente la expresión de la subunidad β 1 de integrina de los miocitos.

Finalmente, los LT son mediadores involucrados en la contracción del músculo liso. Estos mediadores lipídicos producen sus efectos al unirse a su receptor Cys-LT1. La

activación de éste receptor, además de producir contracción del músculo liso, modula la inflamación, las respuestas inmunes y el desarrollo de fibrosis en las vías aéreas (Peters-Golden, 2008). En el cobayo, la obstrucción de las vías aéreas producida por el alérgeno se genera fundamentalmente por la contracción del músculo liso, esta contracción es producida principalmente por la liberación de LT e histamina (Sundström *et al*, 2003); esto nos llevó a suponer un papel crucial del receptor Cys-LT1 en las respuestas al alérgeno y en la hiperreactividad puesto que ambas involucran la contracción del músculo liso de las vías aéreas. No obstante, nuestros resultados mostraron que no hubo cambios estadísticamente significativos en el número de células que expresan el receptor Cys-LT1 en el músculo liso traqueal, ni que su expresión se relacionó con la magnitud de la hiperreactividad. Probablemente la expresión de este receptor no se ve alterada en el asma a pesar de todos los cambios en la vía aérea que este desorden representa.

Conclusiones

El modelo de asma alérgica en el cobayo induce el incremento en la reactividad de la vía aérea (hiperreactividad) a la histamina, así como en el número de miocitos traqueales que expresan el H1R y el TGF β 1.

La magnitud de la hiperreactividad de las vías aéreas en este modelo de asma alérgica se asoció directamente con el número de miocitos traqueales que expresan el H1R y TGF- β 1. No se observó ninguna asociación entre la hiperreactividad y el número de células que expresaban la subunidad β 1 de integrina ni el receptor Cys-LT1.

La expresión de TGF- β 1 y de la subunidad β 1 de integrina en el músculo liso están directamente correlacionadas.

Con estos resultados concluimos que en el músculo liso de las vías aéreas hay un fenotipo asociado a la hiperreactividad de las vías aéreas caracterizado por el incremento en los miocitos traqueales que expresan el receptor H1R y el TGF- β 1 en este tejido.

Referencias

1. Abraham WM, A. A., Serebriakov I, Carmillo AN, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber EA, Gotwals PJ, Koteliensky 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.
2. A., B.; J., A.; L., J.; R.; M.; R., K.; W., P. **Molecular Biology of the Cell.** New York and London. 2002.
3. Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF, van Loon M, Bates JH, Janssen-Heininger YM, Irvin CG. **Transforming growth factor-beta1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Nov 15;176(10):974-82.
4. Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF, van Loon M, Bates JH, Janssen-Heininger YM, Irvin CG, Alessio D'Alessio, Rafia S. Al-Lamki, John R. Bradley and Jordan S. Pober. **Transforming growth factor-beta1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 176(10):974-82.
5. Barnes P.J. **Pharmacology of airway smooth muscle.** *Am J respire crit Care Med.* 1998; 158: s123-132
6. Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Vargas M., Martínez E., Ramos-Ramírez P., Alvarez-Santos M., Hiriart G., Gaxiola M., Hernández-Pando R. **$\beta 1$ -Integrins shedding in a guinea pig model of chronic asthma with remodelled airways.** *Clinical and Experimental Allergy*, 39:740-751, 2009.
7. -Bazán-Perkins B., Segura P., González-Juárez F. **Capítulo 15: Asma, en Diagnóstico y tratamiento en neumología.** González Juárez, Francisco, Suárez Núñez, José Francisco, Editores. Pág. 241-262 Primera edición. Editorial Manual Moderno. 626p. ISBN 9789707293465, 2008.
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. Bentley AM, Walker S, Hanotte F, De Vos C, Durham SR. **A comparison of the effects of oral cetirizine and inhaled beclomethasone on early and late asthmatic responses to allergen and the associated increase in airways hyperresponsiveness.** *Clin Exp Allergy* 1996;26:909-17.
10. 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.
11. Bryce PJ, Mathias CB, Harrison KL, Watanabe T, Geha RS, Oettgen HC. **The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses.** *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1624-32.
12. Burchell JT, Wikstrom ME, Stumbles PA, Sly PD, Turner DJ. **Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Mar;296(3):L307-19.
13. 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: 7-1
14. 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.
15. -Cockcroft D.W, Davis B. E. **Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen.** *J of Asthma* 2006; 43: 175-178.
16. Da Cunha A., Vitkovic L. **Transforming growth factor-beta 1 expression and regulation in rat cortical astrocytes.** *J Neuroimmunol* 1992; 36: 157-169.
17. 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.
18. Estrada E., Uribe Ma. **Atlas de histología de vertebrados.** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D.F. 2002; 223 p.

19. Fong YC, Hsu SF, Wu CL, Li TM, Kao ST, Tsai FJ, Chen WC, Liu SC, Wu CM, Tang CH. **Transforming growth factor-beta1 increases cell migration and beta1 integrin up-regulation in human lung cancer cells.** Lung Cancer. 2009 Apr;64(1):13-21.
20. Giembycz M.A., Raeburn D. **Current concepts on mechanisms of force generation and maintenance in airways smooth muscle.** Pulm Pharmacol 5: 279-297, 1992.
21. 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.
22. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. **Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function.** Pulm Pharmacol Ther. 2009 Oct;22(5):370-8.
23. 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.
24. Kim JH, Jain D, Tliba O, Yang B, Jester WF Jr, Panettieri RA Jr, Amrani Y, Puré E. **TGF-beta potentiates airway smooth muscle responsiveness to bradykinin.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 289(4):L511-20.
25. Leigh R., Ellis R., Wattie J., Southam D.S., De Hoogh M., Gauldie J., O'Byrne P. M., Inman M.D. **Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation.** *Am.J.Respir.Cell Mol. Biol.*2002, 27:526-535.
26. 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.
27. Montes, J.; Flores, J.; Barrón, E.A. **Histamina receptores y agonistas.** 2005. Septiembre 68(3).
28. 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.
29. O'Byrne, M. D. I. a. P. M. 2003. **Airway hyperresponsiveness.** *Chest* 123:411S-416S.
30. Ohkawa C, Ukai K, Miyahara Y, Takeuchi K, Sakakura Y. **Histamine H1 receptor and reactivity of the nasal mucosa in sensitized guinea pigs.** *Auris Nasus Larynx.* 1999 Jul;26(3):293-8.
31. Ozyilmaz E, Canbakan S, Capan N, Erturk A, Gulhan M. **Correlation of plasma transforming growth factor beta 1 with asthma control test.** *Allergy Asthma Proc.* 2009 Jan-Feb;30(1):35-40.
32. 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.
33. Peralta, O., Lagunas, A., Madrid, V. **Factor de crecimiento transformante beta-1 estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer.**2001. Salud pública de México, vol 43 no.4 Julio- Agosto.
34. Peters-Golden M, Henderson WR. **Mechanisms of disease: Leukotrienes.** 2007. *N Engl J Med.* 357:1841-54.
35. -Rodger I. **Excitation-contraction coupling and uncoupling In airway smooth muscle.** *Br. J Clin Pharmacol.* 1985; 20:255S-266S.
36. Roquet A, Dahlen B, Kumlin M, Ihre E, Anstren G, Binks S. **Combined antagonism of leukotrienes and histamine produces predominant inhibition of allergen-induced early and late phase airway obstruction in asthmatics.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1856-63.
37. Sacre A. **Antagonistas de leucotrienos en el tratamiento de la rinitis alérgica y enfermedades concomitantes.** *Revista Alergia México.* 2008; 55(4):164-75.
38. Shirasaki H. **Cysteinyl leukotriene receptor CysLT1 as a novel therapeutic target for allergic rhinitis treatment.** 2008. 12(4):415-23.
39. Sporn MB., Roberts A. **Transforming growth factor- beta , recent progress and new challenges.** *J cell Biol* 1992; 119: 1017-1021.
40. **The Global Burden of Asthma Report. GINA 205. Página electrónica: www.ginasthma.org**

41. 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.
42. 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.
43. Twentyman OP, Ollier S, Holgate ST. **The effect of H1-receptor blockade on the development of early- and late-phase bronchoconstriction and increased bronchial responsiveness in allergen-induced asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:1169-78.
44. Vargas MH. **Patogenia del asma. En: Asma. Enfoque integral para Latinoamérica.** México: McGraw-Hill Interamericana (2005).
45. Ville CA. **Biología** 8a edición. McGraw-Hill Interamericana editores, México 1996, 943pp.
46. Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. **Repeated instillations of Dermatophagoides farinae into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice: effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate.** *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 6;578(1):87-96.
47. Warstat K, Meckbach D, Weis-Klemm M, Hack A, Klein G, Dezwart P, Aicher WK. **TGF-beta enhances the integrin alpha2beta1-mediated attachment of mesenchymal stem cells to type I collagen.** *Stem Cells Dev.* 2010.
48. West, JB. **Fisiología respiratoria**, 6ª edición. Editorial Medica Panamericana, Argentina 2002, pp: 192.
49. White MV. **The role of histamine in allergic diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:599-605.
50. 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.
51. Wipff PJ, Hinz B. **Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship.** *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8-9):601-15.
52. Woolcock AJ, Peat JK. **Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 1989 245-256
53. 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 $\alpha1/\beta1/\alpha v$ and PDGF receptor pathways.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C342-C352.
54. Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. **How Much Do We Know about Atopic Asthma: Where Are We Now?.** *Cellular & Molecular Immunology.* 2006; 3(5): 321-332.
55. 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.