



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA
SUBUNIDAD $\beta 1$ DE INTEGRINA EN LA
MUSCULATURA LISA Y SU ASOCIACIÓN CON
EL DESARROLLO DE HIPERREACTIVIDAD DE
LAS VÍAS AÉREAS EN UN MODELO DE ASMA
ALÉRGICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MAYRA DINORAH ALVAREZ SANTOS

TUTORA PRINCIPAL: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins
COMITÉ TUTOR: Dra. María de Lourdes Segura Valdéz
COMITÉ TUTOR: Dr. Erasmo Martínez Cordero

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo recibido por CONACYT quien otorgó la beca con número de registro 294207.

A los miembros del comité tutor:

Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Dra. María de Lourdes Segura Valdéz

Dr. Erasmo Martínez Cordero

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Cuando llegan estos momentos te vienen a la memoria muchas personas que han participado en la realización de esta tesis, a las cuales tengo que agradecer su granito de arena aportado.

En primer lugar, a mi madre, que con la educación, firmeza y valor que me ha transmitido, he aprendido a luchar siempre en los momentos más difíciles, y con sus palabras de ánimo siempre hace surgir en mí una sonrisa.

A mi familia, por entender y comprender mi ausencia durante la elaboración de la tesis, sobre todo en los últimos meses y que a pesar de la distancia siempre he contado con su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A Blanca Bazán por ayudarme siempre que pudo, tener respuesta a cualquier duda y prestarme todo el tiempo necesario en mis primeros momentos en el desarrollo de este gran proyecto.

A Juana Arellano García, por iniciarme en el trabajo experimental y contar con su apoyo.

Finalmente, a todas aquellas personas que me han brindado su amistad sincera, cariño, confianza, y sobre todo motivación. Gracias por sus consejos, por la paciencia que han mostrado en todo momento, sobre todo en los más difíciles, saber entenderme, escucharme y aguantarme cuando ni siquiera yo era capaz. Porque gracias a ustedes logre salir adelante en lo personal y en la culminación de esta tesis.

A mi familia

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
Vías aéreas.....	14
Asma.....	15
Fisiopatología del asma.....	15
Asma alérgica.....	16
Hiperreactividad de las VA.....	17
El MLVA.....	19
Integrinas.....	19
Subunidad α de integrina.....	20
Subunidad β de integrina.....	21
Subunidad $\beta 1$ de integrina.....	22
Modificaciones post-transcripcionales de la subunidad $\beta 1$ de integrina.....	23
Modificaciones post-traduccionales de la subunidad $\beta 1$ de integrina.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL Y MÉTODO.....	27
Sensibilización antigénica.....	27
Pletismografía barométrica.....	28
Reactividad de las vías aéreas.....	30
Eutanasia de cobayos y extracción de tráquea.....	31
Disgregación celular del MLVA.....	32

Citometría de flujo.....	32
Western blot.....	33
Inmunohistoquímica.....	34
Microscopía electrónica.....	35
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Familia de integrinas.

Figura 2. Estructura general de las integrinas.

Figura 3. Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica.

Figura 4. Equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento.

Figura 5. Corte transversal de la Tráquea de *Cavia porcellus* (cobayo).

Figura 6. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 7. Determinación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 8. Expresión de TGF- $\beta 1$ en los miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 9. Expresión de la IL-13 en los miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 10. Determinación semicuantitativa de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso traqueal en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 11. Relación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso de tráquea en un modelo de asma alérgica.

Figura 12. Expresión de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la pared de la tráquea.

Figura 13. Micrografía representativa de la expresión del dominio extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 14. Expresión semicuantitativa de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el tejido conectivo traqueal en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Figura 15. Relación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo de tráquea en un modelo de asma alérgica.

Tabla 1. Coeficientes de correlación entre el grado de reactividad de la vía aérea con la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, IL-13 y el TGF- $\beta 1$ en el músculo liso traqueal de cobayo.

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre el nivel de expresión del TGF- $\beta 1$ con la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina y la IL-13 en el músculo liso traqueal de cobayo.

Tabla 3. Expresión de diferentes polipéptidos del dominio citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos y tejido conectivo traqueal en un modelo de asma alérgica.

RESUMEN

El aumento de la reactividad (hiperreactividad) de las vías aéreas ante cualquier estímulo, ya sea físico o químico, es el principal componente fisiopatológico del asma. Recientemente observamos en un modelo de asma alérgica en el cobayo la expresión de variantes no celulares ó “acelulares” de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, y que la expresión de estas variantes, que se encuentran unidas a la colágena tipo I y II de la lámina propia, correlaciona directamente con la magnitud de la hiperreactividad. No obstante, en ese mismo estudio se determinó que la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en las bandas de músculo liso (determinada mediante morfometría) también se asocia con el grado de hiperreactividad. Una interrogante derivada de ese estudio es que la marca detectada sobre las bandas de músculo liso en la morfometría no corresponda totalmente a integrina que está en los miocitos, pues podrían ser integrinas acelulares del intersticio, por lo que la relación entre la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en los miocitos con la hiperreactividad aún es desconocida. Nuestro objetivo fue caracterizar la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina directamente en los miocitos del tracto respiratorio y determinar su relación con la reactividad de las vías aéreas. Para esto, cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH se sensibilizaron al antígeno (ovoalbúmina) y posteriormente fueron retados con el antigénico cada diez días ($n = 12$). El cambio en el índice de broncoobstrucción (íB) se evaluó en cada reto mediante pletismografía barométrica. En el tercer reto antigénico se determinó: 1) la reactividad de las vías aéreas a la histamina *in vivo*; 2) la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la pared traqueal mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica; y en miocitos traqueales disgregados enzimáticamente, 3) la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, TGF- $\beta 1$ e IL-13 mediante citometría de flujo; y 4) la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina por western blot. En estos experimentos se incluyó un grupo control de cobayos que solo recibieron retos con solución salina fisiológica ($n = 6$). En todos los retos la administración del antígeno indujo una broncoobstrucción transitoria que al menos triplicó el íB basal. En el tercer reto se observó un incremento significativo en la reactividad de la vía aérea a la histamina en los cobayos del modelo de asma en comparación con los controles ($P < 0.05$). En las células de músculo liso de los cobayos controles, la magnitud de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina fue similar. También fue similar la expresión del dominio extracelular de la integrina y la IL-13 entre los cobayos control y del modelo de asma. Sin embargo, en los cobayos del modelo de asma la expresión del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ integrina y del TGF- $\beta 1$ fue significativamente mayor que en los controles ($P < 0.05$ y $P < 0.01$,

respectivamente). La magnitud de la reactividad de la vía aérea se asoció significativamente ($P < 0.05$) tanto con la expresión en los miocitos del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina como del TGF- $\beta 1$ ($r = 0.35$ y $r = 0.4$, respectivamente). Adicionalmente, la expresión de ambos dominios de la subunidad $\beta 1$ de integrina mostraron una asociación significativa con el TGF- $\beta 1$ ($P < 0.00001$; $r = 0.74$ y $r = 0.8$, dominios extracelular y citosólico, respectivamente). El análisis por western blot de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos traqueales reveló la expresión de varios fragmentos en los cobayos del modelo del asma que corresponden predominantemente al dominio citosólico en comparación al extracelular.

Por otro lado, mediante inmunohistoquímica se identificó tanto en cobayos controles como en los de modelo de asma, la expresión de los dominios citosólico y extracelular tanto en músculo liso como en tejido conectivo, lo cual se corroboró mediante microscopía inmunoelectrónica. El análisis por western blot del tejido conectivo mostró varios polipéptidos de la subunidad $\beta 1$ de integrina que expresan tanto el dominio citosólico como el extracelular. Nuestros datos sugieren que en el modelo de asma en el cobayo hay un incremento en la expresión del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina que se relaciona con la expresión del TGF- $\beta 1$ en los miocitos traqueales. Adicionalmente observamos que el incremento de la reactividad de las vías aéreas está asociado a un fenotipo de miocitos que sobreexpresan estas proteínas; y que durante el desarrollo del asma se podrían estar generando variantes de la subunidad $\beta 1$ de integrina tanto en músculo liso como en tejido conectivo que podrían estar asociadas con la patogénesis de la enfermedad.

ABSTRACT

The increased reactivity (hyperresponsiveness) of the airways to any stimulus, whether physical or chemical, is the main component of asthma pathophysiology. Recently we observed that overexpression of integrin $\beta 1$ subunit found in areas "acellular" of the basement membrane and the lamina propria is directly related to the degree of airway hyperresponsiveness. However, the role of integrins in smooth muscle, a central structure in the control of reactivity is unknown. Our objective was to characterize the expression of integrin $\beta 1$ subunit in tracheal myocytes and its relationship to the reactivity of the airways. For this strain male guinea pigs HsdPoc: DH were sensitized to antigen (ovalbumin) and then were challenged with antigen every ten days (n = 12). The change in the rate of broncoobstrucción (IB) were evaluated in each challenge by barometric plethysmography. In the third challenge antigen was determined: 1) the airway reactivity to histamine in vivo, 2) the expression of integrin $\beta 1$ subunit in the tracheal wall by immunohistochemistry and electron microscopy, and in enzymatically dispersed tracheal myocytes, 3) the expression of integrin $\beta 1$ subunit, TGF- $\beta 1$ and IL-13 by flow cytometry, and 4) the expression of integrin $\beta 1$ subunit by western blot. In these experiments included a control group of guinea pigs that received only saline challenges (n = 6). In all challenges antigen administration induced a transient broncoobstruction at least tripled the basal IB. The third challenge is a significant increase in airway reactivity to histamine in guinea pig model of asthma compared with controls (P <0.05). In smooth muscle cells of control guinea pigs, the magnitude of the expression of cytosolic and extracellular domains of integrin $\beta 1$ subunit was similar. Was similar expression of the extracellular domain of the integrin and IL-13 between the control guinea pigs and model of asthma. However, in the guinea pig asthma model the expression of the cytosolic domain of $\beta 1$ integrin subunit and TGF- $\beta 1$ was significantly higher than in controls (P <0.05 and P <0.01, respectively). The magnitude of airway reactivity was significantly (P <0.05) expression in both myocytes cytosolic domain of $\beta 1$ integrin subunit and TGF- $\beta 1$ (r = 0.35 and r = 0.4, respectively). Additionally, the expression of both domains of integrin $\beta 1$ subunit showed a significant association with TGF- $\beta 1$ (P <0.00001, r = 0.74 and r = 0.8, extracellular and cytosolic domains, respectively). The western blot analysis of $\beta 1$ integrin subunit in tracheal myocytes revealed the expression of several fragments in asthma model guinea pigs under predominantly cytosolic domain compared to extracellular. Furthermore, immunohistochemistry was identified both in controls as guinea pigs in asthma model, the expression of cytosolic and extracellular domains in both smooth muscle and connective tissue, which was corroborated by immunoelectron microscopy.

The western blot analysis showed several of the connective tissue polypeptides of the integrin β 1 subunit expressing both the cytosolic and the extracellular domain. Our data suggest that in the asthma model in guinea pigs there is an increase in the expression of cytosolic domain of β 1 integrin subunit that is related to the expression of TGF- β 1 in tracheal myocytes. Additionally note that the increased reactivity of the airways is associated with a phenotype of myocytes that overexpress these proteins, and that during the development of asthma could be generating variants of the β 1 integrin subunit in both smooth muscle and connective tissue that could be associated with the pathogenesis of the disease.

ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
ADMIDAS	Adyacente al sitio MIDAS
ATP	Adenosina trifosfato
EFG	Factor de crecimiento epidermal
íB	Índice de broncoobstrucción
IgE	Inmunoglobulina E
IL-13	Interleucina-13
MEC	Matriz extracelular
MIDAS	Sitio de adhesión dependiente de un metal iónico
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
OVA	Ovoalbúmina
PD ₂₀₀	Dosis provocativa 200
PSI	Plexina, Semaforina, Integrina
SSF	Solución salina fisiológica
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante-beta 1
VA	Vías aéreas

INTRODUCCIÓN

Vías aéreas

La respiración celular es el proceso mediante el cual la energía química proveniente de carbohidratos, lípidos y proteínas es liberada en forma de adenosina trifosfato (ATP). En organismos multicelulares, como los animales, es fundamental la presencia de un aparato respiratorio que se encargue de suministrar el O₂ ambiental, y en contrasentido, elimine el CO₂ para que se lleve a cabo la respiración celular. La ruta que se encarga de conducir, filtrar, humedecer y calentar el aire ambiental para dirigirlo a las zonas de intercambio gaseoso se conoce como 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 para alcanzar las zonas de intercambio gaseoso (West, 2002).

Estructuralmente las VA se dividen en dos, superiores e inferiores. Las superiores inician en la cavidad nasal y continúan por los senos paranasales, la faringe y la laringe, mientras que las inferiores van de la tráquea, a los bronquios, los bronquiólos y terminan en los bronquiólos respiratorios (Welsch, 2008). Histológicamente la pared de la tráquea y bronquios está compuesta por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes, glándulas subepiteliales, tejido conectivo, músculo liso y placas de cartílago. Por su parte los bronquiólos se caracterizan por presentar un epitelio cuboidal pseudoestratificado ciliado con células Clara, tejido conectivo, músculo liso y carecen de glándulas y cartílago (West, 2002).

El tránsito continuo de aire ambiental a través de las VA genera en estas una gran susceptibilidad de presentar infecciones y enfermedades, y entre las enfermedades más comunes de las VA está el asma (Global Initiative for Asthma GINA, 2009).

Asma

La palabra “asma” es una palabra griega utilizada por Hipócrates para designar síntomas como jadeo o falta de aliento, por lo que cualquier individuo con esta característica era clasificado como asmático. El concepto fue modificado a finales del siglo XIX, cuando se definió al asma como “disnea paroxística de un carácter peculiar con intervalos de respiración sana entre los ataques” (Holgate, 2010). En la actualidad el asma se define como un trastorno complejo y muy heterogéneo de las VA caracterizada por inflamación crónica y manifestaciones repetidas, variables y episódicas de obstrucción transitoria de las VA (Kim et al, 2010; Lloyd y Hessel, 2010).

En la actualidad el asma es un problema de salud pública mundial pues entre 5 al 10% de la población reúne los criterios para ser clasificados como asmáticos. En México durante el año 2006 en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), otorgó atención a 449,002 casos de asma en medicina familiar, 188,274 en otras especialidades médicas, 255,854 en urgencias y se registraron 14,537 egresos hospitalarios por asma (Viniestra, 2010).

A nivel mundial, la muerte anual por asma se ha estimado en 250,000 individuos y la mortalidad parece no correlacionar con la prevalencia (Global Initiative for Asthma GINA, 2009). México tiene una de las tasas más altas de mortalidad por asma de América Latina. El IMSS mostró una tasa de mortalidad de 12.8 por cada 100,000 derechohabientes durante 1990, mientras que la mortalidad general para 1997 se calculó en 20 por cada 100.000 habitantes (Viniestra, 2010).

Fisiopatología del asma

Se han identificado diferentes factores que influyen en el desarrollo del asma, y de manera general se pueden dividir en factores de predisposición, que principalmente son genéticos, y factores desencadenantes, que generalmente son ambientales. Entre los factores genéticos de 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 factores desencadenantes ejercen una gran influencia sobre los factores genéticos 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 ambiental también pueden contribuir a la instalación del asma (Ville, 1996).

Aunque el asma es referida continuamente como una manifestación de 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. Las causas más comunes del asma intrínseca son la poliposis nasal, la sensibilidad a aspirinas y la dependencia a esteroides. El asma intrínseca es cada vez más frecuente en la población, y salvo por la presencia de atopía en el asma alérgica, el asma no alérgica es clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similar al asma alérgica (Vargas, 2005).

Asma alérgica

La alergia es la respuesta del sistema inmune a estímulos externos en individuos sensibilizados. Por esto se conoce al asma alérgica como extrínseca. El proceso alérgico asociado al asma extrínseca se inicia cuando un alergeno ingresa a las VA donde se endocita y procesa por células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas y macrófagos; aunque los basófilos, eosinófilos, células colaboradoras naturales y mastocitos también pueden llevar a cabo ésta función (Kim et al, 2010). Los fragmentos degradados del alergeno son presentados a los linfocitos T vírgenes que se activan, maduran y proliferan como linfocitos T cooperadores del tipo 2 para luego interactuar con los linfocitos B; éstos últimos son los productores de los 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 alérgeno. La expresión del asma es un evento posterior que se inicia cuando aparece de nuevo el alérgeno y es reconocido por la IgE que se encuentra en las células sensibilizadas. Estas células liberan diferentes tipos de mediadores como la histamina, generando tanto respuestas inflamatorias como síntomas respiratorios derivados de la obstrucción de las VA. Aunque la hipersecreción de moco, edema y contracción del músculo liso de la VA (MLVA) son los principales mecanismos que inducen la obstrucción de las VA durante una exacerbación producida por el alérgeno, el principal contribuyente de esta obstrucción es el incremento de la reactividad de la VA a estímulos que usualmente son tolerados por los individuos normales. Este fenómeno es conocido como hiperreactividad de las VA (Ying y Zhao, 2006; Lloyd y Hessel, 2010).

Hiperreactividad de las VA

La hiperreactividad de las VA es una característica fundamental del asma pues se presenta en todos los pacientes con esta enfermedad y su severidad es generalmente proporcional a la severidad del asma (Busse, 2010).

La hiperreactividad de las VA puede ser determinada mediante la estimulación directa del MLVA con agonistas de la contracción como acetilcolina o histamina (Busse, 2010; Cockroft y Davis, 2006). En particular, la histamina puede también activar fibras sensorias en las VA y no sólo contraer directamente el MLVA sino también llevar a una respuesta reflejo que puede a su vez amplificar la contracción. Por otro lado, la hiperreactividad de las VA también puede ser determinada indirectamente cuando las VA se encuentran inflamadas. En este sentido, la adenosina monofosfato es capaz de estimular a los mastocitos para que liberen sus mediadores y éstos provoquen contracción del MLVA de manera independiente a la presencia de IgE (Busse, 2010).

Los factores que contribuyen al desarrollo de la hiperreactividad de las VA se han dividido en dos categorías: el variable y el persistente (Cockroft y Davis, 2006;

O'Byrne, 2003). El variable esta íntimamente asociado al grado de inflamación y depende de los estímulos ambientales, como la presencia de alérgenos, infecciones, contaminantes, etc. (Busse, 2010; Cockroft y Davis, 2006; O'Byrne, 2003). El persistente es independiente del grado de inflamación y se ha atribuido al cambio estructural de las VA (remodelación), que se observa en el asma crónica donde se engrosan las paredes de la VA por hipertrofia e hiperplasia de las células que la conforman y por depósito de componentes de la matriz extracelular (MEC) (Busse, 2010; Cockroft y Davis, 2006; O'Byrne, 2003).

Aun se desconocen las causas del desarrollo de hiperreactividad de las VA, no obstante se han observado que varias moléculas podrían estar involucradas. Por ejemplo, un mediador central asociado a la magnitud de la hiperreactividad de las VA durante el asma extrínseca es la interleucina 13 (IL-13). Se ha demostrado que hay un incremento en la expresión de la IL-13 en células de fluidos de lavado broncoalveolar obtenido de pacientes con asma, y que su liberación en células epiteliales de las VA de ratón causa hiperreactividad de las VA a metacolina. Además, la neutralización de IL-13 por la administración sistémica de un anticuerpo inhibe la hiperreactividad de las VA inducida por alérgeno en ratones sensibilizados (Yoshihito et al, 2010).

EI MLVA

El MLVA participa en muchos aspectos patológicos del asma pues es el principal actor de la hiperreactividad y tono de las VA, además de participar en la perpetuación y amplificación de la inflamación y la remodelación de las VA (Busse, 2010; Cockroft y Davis, 2006; Girolamo et al, 2008). Las propiedades mecánicas del MLVA son fundamentales para la regulación de sus funciones, particularmente del proceso de contracción.

El proceso de contracción del MLVA se inicia por la entrada de Ca^{2+} a la célula cuando el MLVA es estimulado por agonistas de la contracción como acetilcolina o histamina. El Ca^{2+} se une a la calmodulina aumentando su afinidad por 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 de la ATPasa de miosina activándola y permitiendo la interacción de los filamentos de actina y miosina e iniciando el desarrollo de tensión muscular. Cuando el Ca^{2+} disminuye, la cinasa de la cadena ligera de miosina se inactiva, la miosina se desfosforila y el músculo se relaja (Gunst y Tang, 2000; Rodger, 1085).

En el músculo liso, a diferencia del estriado, no hay un arreglo de las fibras de miosina y actina en bandas paralelas, sino en paquetes dentro de la célula que interaccionan con la superficie interna de la membrana llamadas “bandas densas” o “placas densas”. Estas placas densas están acopladas a las de células adyacentes en áreas llamadas placas de anclaje. Las placas densas asociadas a la membrana regulan la transmisión de fuerza de contracción con la MEC, donde las placas de anclaje proveen un acople mecánico entre miocitos adyacentes (Kim et al, 2008).

Las placas densas son similares en composición molecular a los sitios de adhesión focal. Uno de los componentes de las adhesiones focales son las integrinas que anclan a proteínas de MEC por el medio externo y a proteínas del citoesqueleto como vinculina, talina, α -actinina y paxilina por el medio citosólico (Gunst y Tang, 2000).

Integrinas

El término “integrina” fue aplicado por primera vez a finales del año de 1985 para describir a la mayor familia de receptores transmembranales de la superficie celular. Estos receptores regulan señales de la MEC con el citoesqueleto, y viceversa, mediando funciones celulares como la migración, adhesión y proliferación celular, entre otras (Hynes, 1987). Excepto en eritrocitos, todos los tipos celulares expresan una o más integrinas (Hemler, 1990), y en mamíferos pueden ser encontradas más de 20 integrinas distintas (Kreidberg y Symons, 2000).

La primera integrina descrita fue el receptor de la fibronectina (Pytela, 1985) que, junto con los demás miembros de esta familia descubiertos posteriormente, muestran la misma estructura básica: glicoproteínas transmembranales constituidas por dos cadenas proteicas, o subunidades α y β . De la subunidad α se conocen hasta el momento 18 subunidades y 8 de la β , que combinadas producen los 24 heterodímeros de integrina hasta ahora conocidos (Fig. 1).

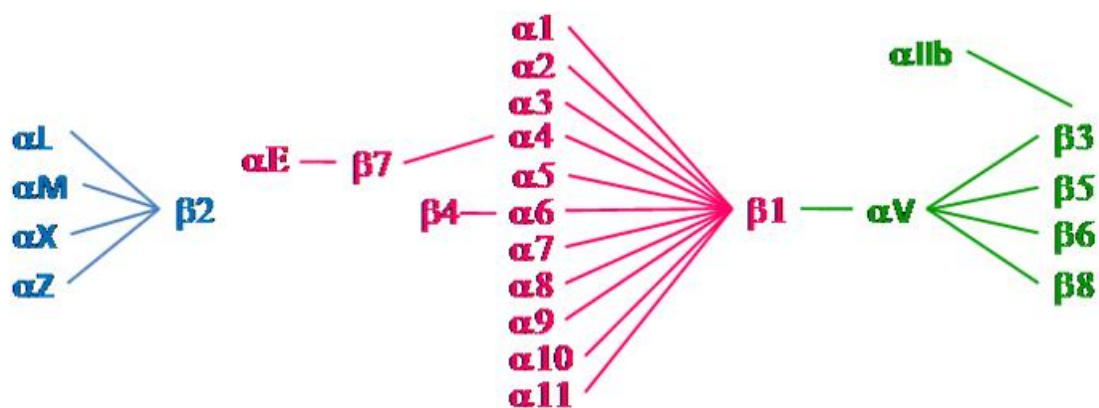


Figura 1. **Familia de integrinas.** Hay tres grupos principales: $\beta 2$, $\beta 1$ y αV . (modificado de Hynes, 2002)

Las subunidades α y β son proteínas transmembrana tipo I, es decir, contienen un gran dominio extracelular y un pequeño dominio citosólico con 700-1100 y 30-50 residuos de aminoácidos, respectivamente (Fig. 2). Todos los dímeros de las integrinas se disocian por detergentes iónicos, indicando que las subunidades están unidas por interacciones no covalentes (Humphries, 2000).

Subunidad α de integrina

La subunidad α está compuesta de 7 hélices β interconectadas con forma circular. Esta subunidad posee un dominio Calf-1 y otro Calf-2 que forman una estructura tipo "pierna" que soporta el círculo. Las últimas 4 hélices β contienen dominios tipo EF que unen Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} en estos sitios afecta

alostéricamente la unión al ligando (Kreidberg y Symons, 2000; Pytela et al, 1985; Hynes, 2002; Barczyk y Carracedo, 2010). De las 18 subunidades α conocidas, sólo 8 tienen un dominio I que contiene aproximadamente 200 residuos de aminoácidos y esta insertado entre las hojas 2 y 3 de la hélice β . El dominio I está formado por 5 hojas β -plegadas y 7 hélices α . La unión al ligando ocurre por la unión coordinada de un ión de Mg^{2+} en el motivo sitio de adhesión dependiente de ion metal (MIDAS), (Ruoslahti, 1995; Humphries, 2000). El dominio I con una α -hélice extra tiene la capacidad de interactuar con fibras de colágena. En general el dominio I es altamente homólogo entre la integrinas a diferencia del dominio citosólico que es muy divergente. El área entre el dominio híbrido de la subunidad β y la superficie de la hélice β de la subunidad α es crucial para la heterodimerización que ocurre en retículo endoplásmico. Generalmente hay un exceso de subunidad β en el retículo endoplásmico y la cantidad de subunidad α determinará la cantidad de receptor que puede ser transportado a la membrana plasmática. Subunidades α y β libres no se encuentran en la membrana plasmática (Barczyk y Carracedo, 2010).

Las integrinas tienen una relación importante con el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). En fibroblastos de ratón, el TGF- $\beta 1$ regula la expresión de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, y los mecanismos incluyen activación de los complejos latentes del TGF- $\beta 1$ así como el incremento en su señalización (Eiko et al, 2010). El TGF- $\beta 1$ no sólo interactúa con las integrinas, sino también induce su transcripción génica en fibroblastos de humano (Dmitri et al, 2008).

Subunidad β de integrina

La subunidad β contiene los dominios PSI (Plexina, Semaforina e Integrina), híbrido, βI y 4 repeticiones del factor de crecimiento epidermal (EFG) ricos en cisteína. El dominio βI contiene un sitio de unión al Mg^{2+} adyacente al sitio MIDAS (ADMIDAS) que se une a un ion de Ca^{2+} inhibitorio. El sitio ADMIDAS une un ion de Mg^{2+} llevando

a un cambio conformacional resultando en una forma activa. Las cadenas β comparten homología en el tallo citosólico con motivos NPX/Y capaces de unir proteínas con dominio PTB. Proteínas como talina 1 y 2 activan integrinas por la unión a sus tallos β , mientras que filamina A regula negativamente ésta activación (Barczyk, 2002).

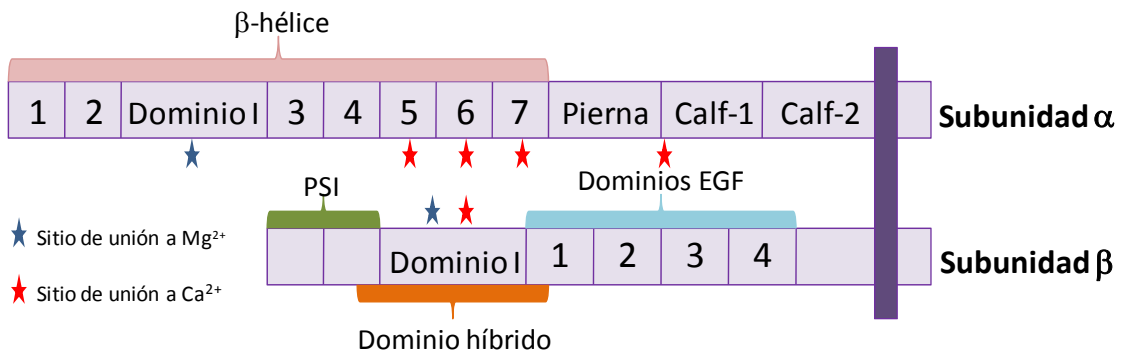


Figura 2. **Estructura general de las integrinas.** El dominio extracelular de la subunidad α es el responsable de la unión a ligando (célula-célula o célula-matriz), mientras que el dominio citosólico de la subunidad β es el que participa en la unión a componentes del citoesqueleto y en la activación de cascadas de señalización intracelular. La barra morada corresponde al dominio transmembranal (Basado en Barczyk, 2010).

Subunidad $\beta 1$ de integrina

La familia de integrinas $\beta 1$ está constituida por doce heterodímeros que incluyen de la $\alpha 1$ a la $\alpha 11$ y a αv . Cada una constituye una molécula distinta con diferentes propiedades y características. Las integrinas $\beta 1$ están ampliamente distribuidas y predominantemente son receptores de moléculas de la MEC como fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina. La familia de las $\beta 1$ integrinas también es conocida como familia VLA (Very Late Antigens), debido a que sus miembros fueron los primeros originalmente definidos como heterodímeros y que se expresaban de 2-4 semanas después de la activación *in vitro* de las células T (Hemler, 1988).

Los dominios extracelular, transmembranal y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina están codificados en un único gen, *ITGB1* en humanos y el locus se localiza en el cromosoma 10 *p11.22*.

En las VA la subunidad $\beta 1$ de integrina se expresa en músculo liso, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T (Abraham et al, 2004; Nguyen et al, 2005). La activación de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el MLVA por colágena monomérica tipo I y fibronectina regula la capacidad de diferenciación, secreción y proliferación del músculo (Nguyen et al, 2005; Peng et al, 2005). Adicionalmente, la cinasa asociada a esta integrina, que interactúa con el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$, puede activar y regular la contracción del músculo liso vascular directamente por fosforilación de la miosina e indirectamente por inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (Boudreau, 1999; Liu, 2000; Hannigan et al, 1996; Deng et al, 2002). Finalmente, en un modelo de asma alérgica en la oveja, el tratamiento con anticuerpos contra las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ evita el desarrollo de la hiperreactividad de las VA (Abraham et al, 2004).

Modificaciones post-transcripcionales de la subunidad $\beta 1$ de integrina.

Se han realizado muchos estudios para entender el papel del dominio citoplásmico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la modulación de las funciones celulares. A su vez, se han descrito variantes de la subunidad $\beta 1$ de integrina que son generadas por eventos de empalme alternativo que crean secuencias citoplásmicas únicas (Mara, 1997). Es importante mencionar que hasta el momento no se conocen variantes del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina que se hayan generado por un proceso de empalme alternativo y ni se han descrito en procesos patológicos.

Modificaciones post-traduccionales de la subunidad $\beta 1$ de integrina.

El dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina tiene la peculiaridad de poseer 12 sitios potenciales para ser glicosilados (Scott A. et al., 1987). Se ha observado que en cáncer, las integrinas presentan un incremento en la glicosilación, lo que modifica sus funciones de adhesión provocando que las células se desanclen y migren.

Por otro lado se ha observado en un modelo de asma alérgica que el dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina se expresa de manera “acelular” unido a la MEC (Bazán-Perkins et al., 2009). Es probable que la proteína podría encontrarse en estas zonas debido a corte proteolítico. Este tipo de modificación es irreversible, sin embargo la proteína puede conservar su función biológica o incluso generar una función diferente (Jeffrey W., 1997)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente describimos que la inflamación crónica en un modelo de asma alérgica en el cobayo puede inducir la expresión de variantes no celulares ó acelulares de las integrinas $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$, y que la expresión de estas variantes, que se encuentran unidas a la colágena tipo I y II de la lamina propia, correlaciona directamente con la magnitud de la fibrosis, inflamación, obstrucción e hiperreactividad de las VA (Bazán-Perkins et al, 2009). En ese mismo estudio, se describió que la expresión de la subunidad $\beta1$ de integrina en el MLVA (determinada mediante morfometría) correlaciona directamente con el grado de hiperreactividad de las VA. No obstante, debido a que encontramos variantes acelulares sobre la MEC, es probable que la marca detectada sobre las bandas de músculo en la morfometría no corresponda totalmente a integrina que está en los miocitos, pues podrían ser integrinas acelulares del intersticio, por lo que la relación entre la expresión de la subunidad $\beta1$ de integrina en los miocitos y con el grado de reactividad de las VA aún es desconocida.

HIPÓTESIS

El desarrollo de hiperreactividad de las VA se asocia con el incremento en la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el MLVA en un modelo de asma alérgica.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en un modelo de asma alérgica en el cobayo y relacionarla con el desarrollo de hiperreactividad de las VA.

Particulares

1. Determinar la reactividad de las vías aéreas en cobayos sensibilizados y retados repetitivamente con ovoalbúmina.
2. Evaluar la expresión de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso traqueal de cobayo.
3. Relacionar la expresión del dominio extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina de músculo liso con el desarrollo de hiperreactividad de las VA en el cobayo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 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 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 antigénica

En el día uno, se preparó una solución 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). Se le inyectó a los cobayos 1 ml de la solución anterior por vía sistémica. A 6 cobayos controles se les administró una inyección con el mismo volumen pero únicamente con SSF (Fig. 3).

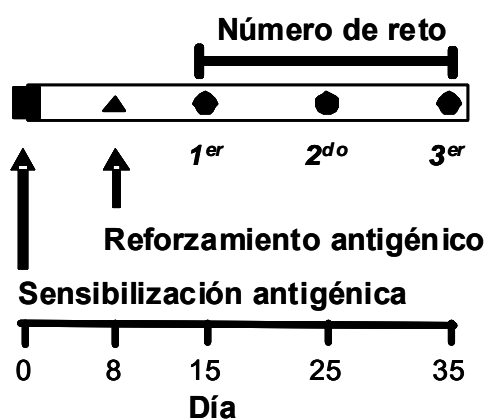


Figura 3. Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica.

Pletismografía barométrica

En el día 8 se reforzó la sensibilización de los cobayos con OVA (Fig. 3), para esto, se colocó al cobayo dentro de una cámara donde se registró el índice de broncoobstrucción (íB) basal con la ayuda de un pletismógrafo barométrico (Fig. 4) para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Posteriormente se les suministró aerosoles de OVA (3 mg/ml SSF) durante 5 min con un nebulizador US-Bennett (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 de broncoobstrucción máxima.

El sistema de pletismografía barométrica 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. 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 íB fue el promedio de 15 s de lecturas y, de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período.

El íB 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

~25°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 pletismografía 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 (Hamelmann et al, 1997). La información es procesada para dar el valor del íB que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\text{íB} = [(T_e - T_r) / T_r] [PFE / PFI]$$

donde:

Te = Tiempo total espiratorio (s)

Tr = Tiempo total de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (presión positiva máxima, cmH₂O)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH₂O)

Los días 15, 25 y 35 se realizaron tres retos con el antígeno, el día 15 se administró una solución de 20 mg de OVA disuelto en 20 ml de SSF. Los días 25 y 35 con se administró una solución de 10 mg de OVA disuelto en 20 ml de SSF. Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado durante una hora. Los cobayos control solo recibieron SSF durante los retos.

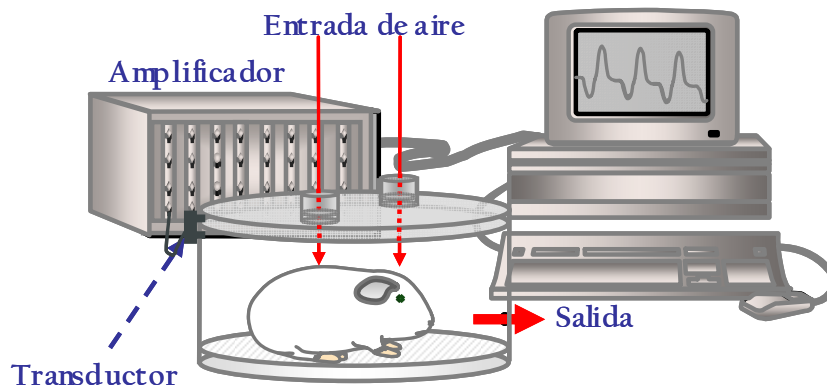


Figura 4. **Equipo de pleetismografía barométrica para animales en libre movimiento.** En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pleetismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registrara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

Reactividad de 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 \dot{V}_B basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma St Louis, EU) durante 1 min. Para cada dosis se registró el \dot{V}_B durante 5 min 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 \dot{V}_B (Dosis provocativa 200 ó PD_{200}). Después se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un \dot{V}_B aproximado al 50% del valor basal (Bazán-Perkins et al, 2004), y se retó con aerosoles de OVA (0.5 mg/ mL SSF, 1 min). La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva.

Eutanasia de los cobayos y extracción de tráquea

Veinticuatro horas después de terminada la segunda curva de histamina, los cobayos se eutanasiaron mediante una sobredosis con pentobarbital sódico (28 mg/Kg). Una vez que los cobayos tuvieron paro cardiorespiratorio, se les realizó una incisión en el cuello para disecar la tráquea (Fig. 5).

A la tráquea se le eliminó la fascia superficial para seccionarla en cuatro partes, cada una de 4 anillos traqueales. Cada parte de la tráquea se empleó para hacer un estudio diferente. La primera parte de la tráquea (1-4 anillos traqueales) se empleó para la citometría de flujo. La segunda parte de la tráquea (5-8 anillos traqueales) se utilizó para realizar el western blot. La tercera parte de la tráquea se usó para realizar la inmunohistoquímica y la cuarta parte de la tráquea para la microscopía inmunoelectrónica.



Figura 5. Tráquea de *Cavia porcellus* (cobayo). Sección transversal. Luz de la tráquea (L), mucosa (M), tejido conectivo laxo (CT), anillo cartilaginoso hialino con forma de herradura (C), tejido muscular liso (ML). HE, 5x.

Disgregación celular del MLVA

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, USA) 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, USA) 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, USA). Utilizando una solución de Krebs fresca se llevó a cabo una segunda incubación a 37°C hasta que las células se observaron disgregadas. Esto se corroboró al revisar continuamente alícuotas que se observaron en un microscopio (Olympus, modelo CH30LF100). Una vez disgregadas las células, toda actividad enzimática fue detenida adicionando solución de Leibovitz (Gibco, New Cork, USA). Las células disgregadas fueron concentradas mediante dos centrifugaciones a 600 rpm durante 5 min, separadas por un lavado con solución Leibovitz (Gibco, New Cork, USA).

Citometría de flujo

Las células de MLVA disgregadas de cada cobayo se dividieron en dos grupos (de un millón de células cada uno). El grupo que se usó como control de isotipo, se incubó por cuatro horas a 37°C en baño maría en 1 ml de RPMI (Gibco, USA) y 4 µl de brefeldina A (Sigma, USA). El otro grupo se incubó en 1 ml de RPMI (Gibco, USA), 4 µl de brefeldina A (Sigma, USA), 10 µl de forbol 12-miristato, 13-acetato y 5 µl de ionomicina (Sigma, USA). En ambos grupos se aumentó la permeabilidad de la membrana celular de todas las células mediante la incubación con 1.5 ml de saponina (Sigma, USA), 0.1%, albúmina sérica de bovino (Sigma, USA), 10%, HEPES 0.01M (Sigma, USA) y 100 µg/µl de IgG de cerdo disuelto en 100 ml de PBS para bloquear

los sitios no específicos durante 10 min agitando suavemente a temperatura ambiente. Después ambos grupos se incubaron con anticuerpos contra el dominio citosólico (Anticuerpo anti- β 1 de humano hecho en conejo, Chemicon, USA) y extracelular (Anticuerpo anti- β 1 de humano hecho en ratón, Santa Cruz Biotechnology, USA) de la subunidad β 1 de integrina, la IL-13 (Anticuerpo anti-IL-13 de humano hecho en ratón conjugado con PE, BD Biosciences Pharmingen, USA) y el TGF- β 1 (Anticuerpo anti-TGF- β 1 de humano hecho en conejo, SantaCruz Biotechnology, USA). En todos los casos se utilizó una dilución de 1 μ l por millón de células y los anticuerpos primarios se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, las células se lavaron con 1.5 ml de solución saponina, y 0.1%, HEPES 0.1 M disuelto en 300 ml de PBS. Posteriormente las células se incubaron durante 30 min con los anticuerpos secundarios: anti-IgG ratón marcado con FITC mouse (BD Biosciences Pharmingen, USA) y anti-IgG conejo marcado con Cy5PE (Santa Cruz Biotechnology, USA) en las condiciones antes mencionadas. Se lavaron de nuevo con 1.5 ml de solución saponina 0.1%, HEPES 0.1 M 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).

Western Blot

La fracción de la tráquea correspondiente se agregó en una solución de lisis celular (BioRad, USA) y posteriormente se colocó el tejido en un sonicador. Se hizo una cuantificación de proteínas totales con el reactivo de Bradford (BioRad, USA). Cuarenta microgramos de proteínas se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 10%, bajo condiciones reductoras y posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, USA). Las membranas fueron bloqueadas 2 horas a 37° C en leche en polvo libre de grasas al 3% en TBST (0.1M Tris, 0.5M NaCl y 1% Tween 20), posteriormente las membranas fueron lavadas en TBST al 0.1% e incubadas toda

la noche con el anticuerpo primario para el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina (Anticuerpo anti- $\beta 1$ de humano hecho en conejo, Chemicon, USA) y extracelular (Anticuerpo anti- $\beta 1$ de humano hecho en ratón, Santa Cruz Biotechnology, USA). Las membranas se lavaron nuevamente con TBST y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a 37° C. Además de los anticuerpos primarios contra las integrinas citosólica y extracelular se usó un anticuerpo contra alfa actina a fin de evaluar la expresión basal de este componente. Posteriormente se lavó la membrana en TBST durante 5 min 4 veces y se incubó con un sustrato quimioluminiscente (Pierce, USA) durante minuto y medio. Las membranas se expusieron a una placa CL-Xposure (Pierce, USA) y fueron reveladas para su posterior análisis. La presencia de cada una de las bandas correspondientes a la subunidad $\beta 1$ de integrinas se evaluó identificando el perfil de bandas detectadas por los anticuerpos específicos y mediante su densitometría mediante el software ImageJ.

Inmunohistoquímica

Los anillos traqueales se fijaron en solución amortiguadora de formalina al 10% y posteriormente se incluyeron en parafina. Secciones de 3 μm se desparafinaron a 55 °C durante 20 min y se rehidrataron en alcoholes graduados pasando primero por xileno hasta alcohol al 70% (10 min en cada paso) y finalmente por agua destilada. La recuperación antigénica se hizo con buffer de citratos 10 mM a pH 6 por 5 min en el horno de microondas. Las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno (3%) para bloquear la peroxidasa endógena y los sitios no específicos fueron bloqueados después con suero de caballo (2%). Las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con los siguientes anticuerpos: anticuerpo para el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina a una dilución 1:50 (Anticuerpo anti- $\beta 1$ de humano hecho en conejo, Chemicon, USA) y extracelular (Anticuerpo anti- $\beta 1$ de humano hecho en

ratón, Santa Cruz Biotechnology, USA) Para detectar la unión específica de los anticuerpos primarios se usó un Kit Universal R.T.U. Vectastain (Vector laboratorios, USA), en el cual los tejidos fueron incubados secuencialmente con suero bloqueador, anticuerpo secundario específico y un complejo peroxidasa/streptoavidina. Finalmente se usó 3,3'-diaminobenzidina (BioRad, USA) como cromógeno. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer. Las laminillas fueron lavadas 2 veces con TBST durante cada proceso. Como control de unión no específica del anticuerpo secundario, secciones de la misma tráquea fueron procesadas sin el anticuerpo primario.

Microscopía electrónica

Se realizó microscopía inmunoelectrónica para determinar la localización subcelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la tráquea. Para esto, cinco animales con modelo de asma se eutanasiaron y se disecaron pequeños fragmentos de la tráquea para ser deshidratados en alcoholes graduados y embebidos en resina hidrosoluble LR-White (London Resin Co., Hampshire, UK). Secciones de 1 μm se tomaron de 5 bloques diferentes por animal y se tiñeron con azul de toluidina y se revisaron las distintas estructuras que conforman la tráquea usando microscopía convencional. Los tejidos seleccionados fueron ajustados para reducir el área seleccionada de las secciones, 70-90 nm de ancho fueron obtenidas y colocadas en rejillas de níquel e incubadas toda la noche a 4°C con los mismos anticuerpos específicos para la subunidad $\beta 1$ de integrina diluidos 1/5 en PBS. Las rejillas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con sus anticuerpos secundarios respectivos conjugados a partículas de oro de 5 nm ó 10 nm (Sigma) diluidos 1/20 en PBS. Las rejillas fueron contrastadas con sales de uranio (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) y examinadas con un microscopio electrónico

M-10 Zeiss (Karl Zeiss, Jena, Germany). Como control negativo, suero de conejo normal fue sustituido por el anticuerpo primario.

Análisis estadístico

La reactividad de la vía aérea a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% (PD_{200}), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el íB basal. Las comparaciones entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba no-pareada de t de Student. Para la asociación con la subunidad de integrina $\beta 1$ se usó el coeficiente de correlación de Spearman. La significancia estadística se estableció con una $P < 0.05$. Los valores en las figuras fueron expresados como la media \pm el error estándar.

RESULTADOS

1. Reactividad de las VA.

En los cobayos controles, 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 antigénico. La relación PD_{200} basal/ PD_{200} post-reto, que representa el grado de reactividad de las VA, fue cercana a 1 en este grupo control ($n = 6$). 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 aumentó (hiperreactividad) y resultó significativamente mayor a la del grupo control ($P < 0.05$, $n = 12$; Fig. 6).

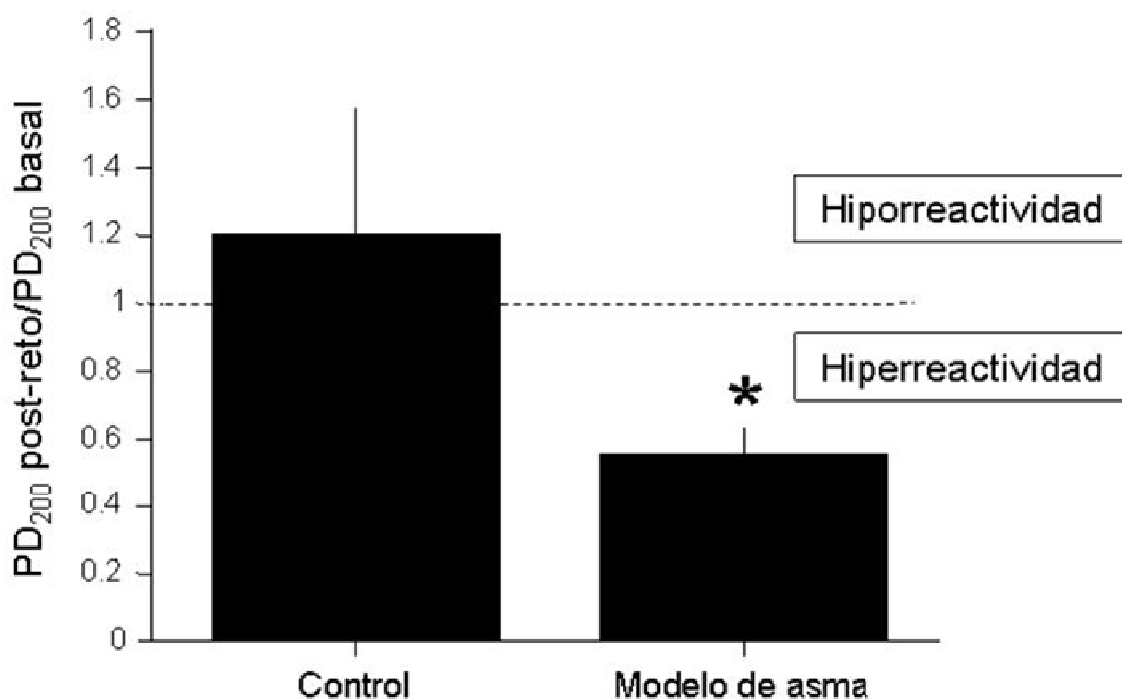


Figura 6. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica en el cobayo. La gráfica muestra la dosis de histamina requerida para producir el 200% de incremento del índice de obstrucción basal (PD_{200}). La línea discontinua en el centro de la gráfica señala el límite entre hiporreactividad e hiperreactividad. $n = 6$, 12 respectivamente para control y modelo de asma. * $P < 0.05$; prueba no-pareada de t de Student. Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

2. Determinación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el músculo liso traqueal mediante citometría de flujo.

En las células de músculo liso traqueal de los cobayos controles, la magnitud de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina fue similar ($n = 6$). En los cobayos del modelo de asma ($n = 12$) la expresión del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ integrina fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que en los controles (Fig. 7). El porcentaje de miocitos que expresaron el dominio extracelular en los cobayos control y en la del modelo de asma fue similar.

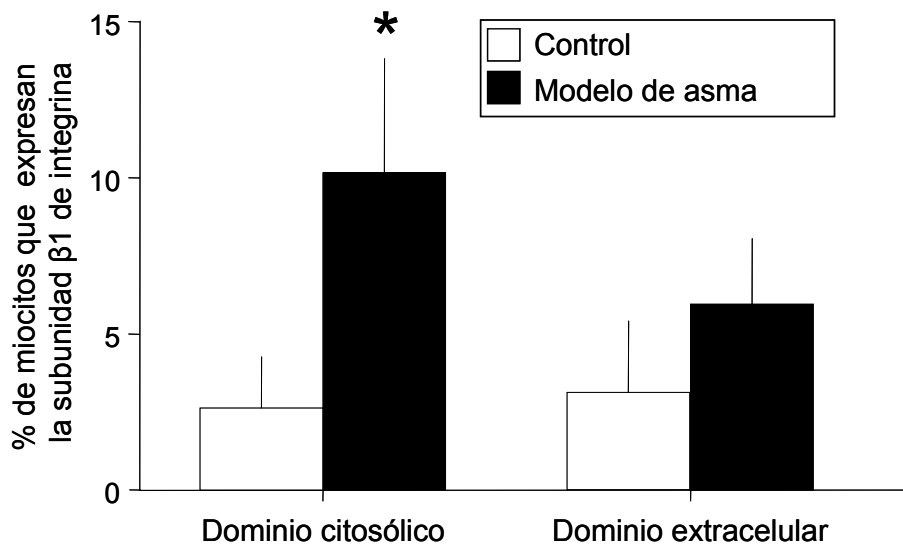


Figura 7. Expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo. $n = 6, 12$ respectivamente para control y modelo de asma. $*P < 0.05$ comparado con el control (prueba no pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

3. Expresión de TGF- β 1 e IL-13 en músculo liso traqueal en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Mediante citometría de flujo se determinó que el porcentaje de miocitos que expresan TGF- β 1 en los controles fue casi nulo; no obstante hubo un incremento significativo en el porcentaje de miocitos que expresaron TGF- β 1 en los cobayos del modelo de asma (* P <0.001; n = 6 y 12 respectivamente; Fig. 8). El porcentaje de miocitos que expresaron IL-13 tanto en los controles como en el modelo de asma fue similar (Fig. 9).

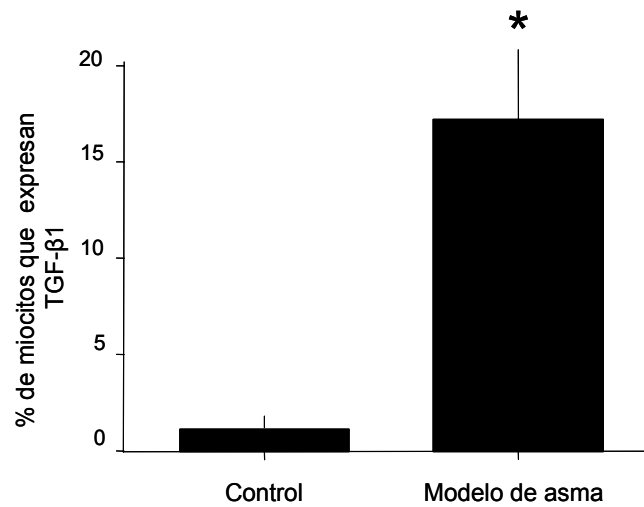


Figura 8. **Expresión de TGF- β 1 en los miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** n = 6, 12 respectivamente para control y modelo de asma. * P <0.001; prueba no-pareada de t de Student. Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

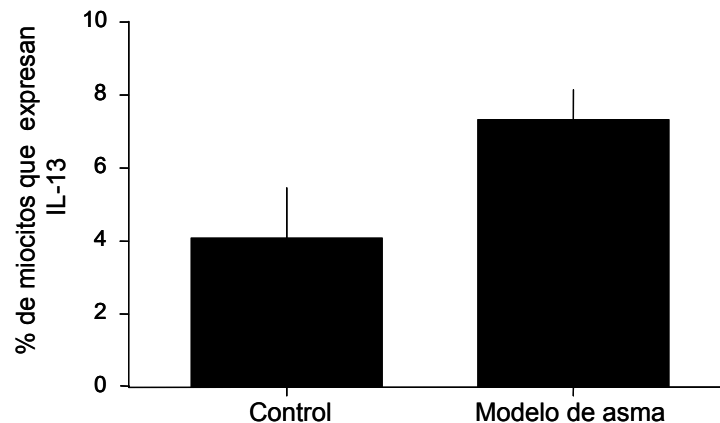


Figura 9. **Expresión de la IL-13 en los miocitos traqueales en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** n = 6, 12 respectivamente para control y modelo de asma. Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

4. Relación entre la magnitud de la reactividad de la VA con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, IL-13 y TGF- $\beta 1$.

En la tabla 1 se muestran los coeficientes de correlación de la magnitud de la reactividad de las VA con la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina, IL-13 y TGF- $\beta 1$ en miocitos traqueales. La magnitud de la reactividad tuvo una correlación negativa, esto es, a mayor reactividad, mayor expresión del dominio citosólico de $\beta 1$ integrina y de TGF- $\beta 1$ en los miocitos, y ambas fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$). No se observó ninguna asociación entre la magnitud de la reactividad de la VA y la expresión del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina y de la IL-13.

Tabla 1. Coeficientes de correlación entre el grado de reactividad de la VA con la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, IL-13 y el TGF- $\beta 1$ en el MLVA.

	Subunidad $\beta 1$ de integrina		IL-13	TGF- $\beta 1$
	Dominio citosólico	Dominio extracelular		
Reactividad de la vía aérea	-0.349*	-0.317	-0.053	-0.398*

Los valores negativos indican una relación directa con la magnitud de la reactividad, esto es porque los valores de la reactividad son obtenidos mediante el cociente de la PD₂₀₀ basal con la PD₂₀₀ post-reto de histamina (post-reto /basal). * $P < 0.05$, prueba de t de Student, $n = 18$.

En la tabla 2 se muestra que hubo una asociación significativa entre la expresión de ambos dominios de la subunidad $\beta 1$ de integrina con el TGF- $\beta 1$. No se encontró asociación entre las expresión de TGF- $\beta 1$ con IL-13.

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre el nivel de expresión del TGF- $\beta 1$ con la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina y la IL-13 en el MLVA.

	Subunidad $\beta 1$ de integrina		IL-13
	Dominio citosólico	Dominio extracelular	
TGF- $\beta 1$	0.725*	0.795*	0.355

* $P < 0.0001$, prueba de t de Student, $n = 18$.

5. Determinación semicuantitativa de la expresión de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en los miocitos traqueales.

El anticuerpo específico para el reconocimiento del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina reveló que los cobayos control presentaron 6 bandas con peso molecular de 220, 170, 130, 120, 110 y 60 kDa respectivamente. En los cobayos del modelo de asma, la expresión –por densitometría– de la banda de 170 kDa disminuyó mientras que la 110 kDa aumentó de manera significativa ($P < 0.001$ en ambos, $n = 3$; Fig. 10) y el resto de las bandas no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. Adicionalmente, se observaron algunas bandas con pesos de 80, 75 y 50 kDa solo en los cobayos del modelo de asma pero no en los controles (Fig. 10). Por otro lado, el anticuerpo contra la subunidad $\beta 1$ de integrina extracelular permitió identificar bandas de 220, 130, 110 y 60 kDa como se observó con el anticuerpo anti integrina $\beta 1$ citosólico (Fig. 10). Solo una banda, la de 70 kDa se reveló con el marcaje del dominio extracelular de esta subunidad, pero no con el citosólico.

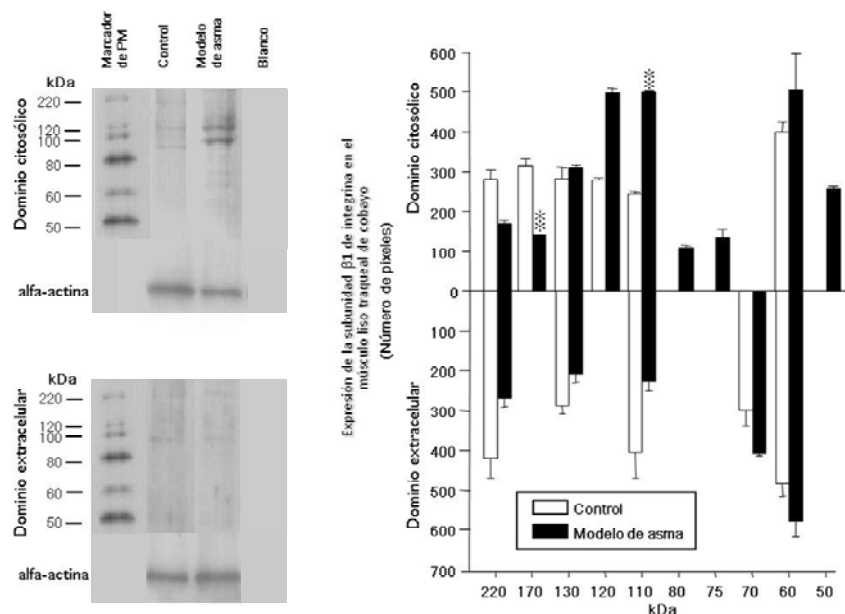


Figura 10. **Cuantificación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso traqueal en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** Western blot representativo de tres repeticiones. El blanco nos indica que no hay marca inespecífica de los anticuerpos empleados para la identificación de la proteína. Comparaciones entre control y modelo de asma. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$, prueba t de Student no pareada. Las barras corresponden a promedios \pm error estándar. $n = 3$ respectivamente para control y modelo de asma.

6. Relación de la expresión entre los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el músculo liso traqueal.

En la figura 11 se muestra la relación entre la expresión del dominio citosólico con respecto al extracelular de las proteínas 220, 130, 110 y 60 kDa, que fueron las que expresaron ambos dominios de la subunidad $\beta 1$ de integrina. En los controles, la relación entre ambos dominios no mostró diferencias estadísticamente significativas. En los animales del modelo de asma, la banda de 220 kDa mostró un incremento en la expresión del dominio extracelular con respecto al citosólico ($P < 0.01$); mientras que para las bandas de 130 y 110 kDa el aumento correspondió a la expresión del dominio citosólico en comparación con el extracelular ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; Fig. 11). En el caso de la banda de 60 kDa no hubo diferencias significativas. Finalmente, la relación entre los dominios de los animales del modelo de asma fue significativamente mayor que la de los controles para la proteína de 110 kDa ($P < 0.01$; Fig. 11).

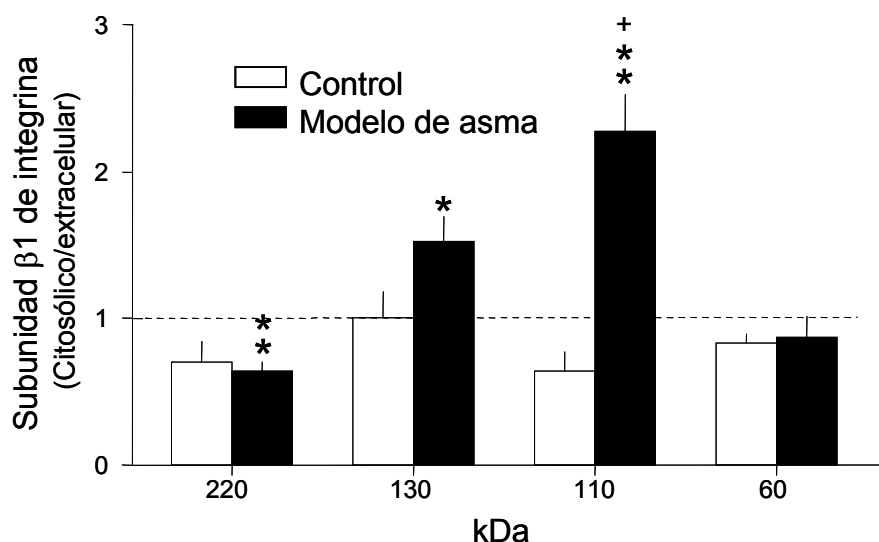


Figura 11. **Relación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso traqueal en un modelo de asma alérgica.** $n = 3$ respectivamente para control y modelo de asma. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ para las comparaciones entre de la expresión del dominio citosólico en relación con el extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, prueba de t de Student pareada. + $P < 0.01$ comparado con el control (prueba no pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

7. Expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la pared traqueal.

Por medio de inmunohistoquímica, se identificó la expresión del dominio extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina sobre el músculo liso traqueal tanto de animales control como de animales con modelo de asma. Con respecto al tejido conectivo, también se observó la expresión de ambos dominios, el extracelular y el citosólico, tanto en tejido de cobayos control como del modelo de asma (Fig. 12).

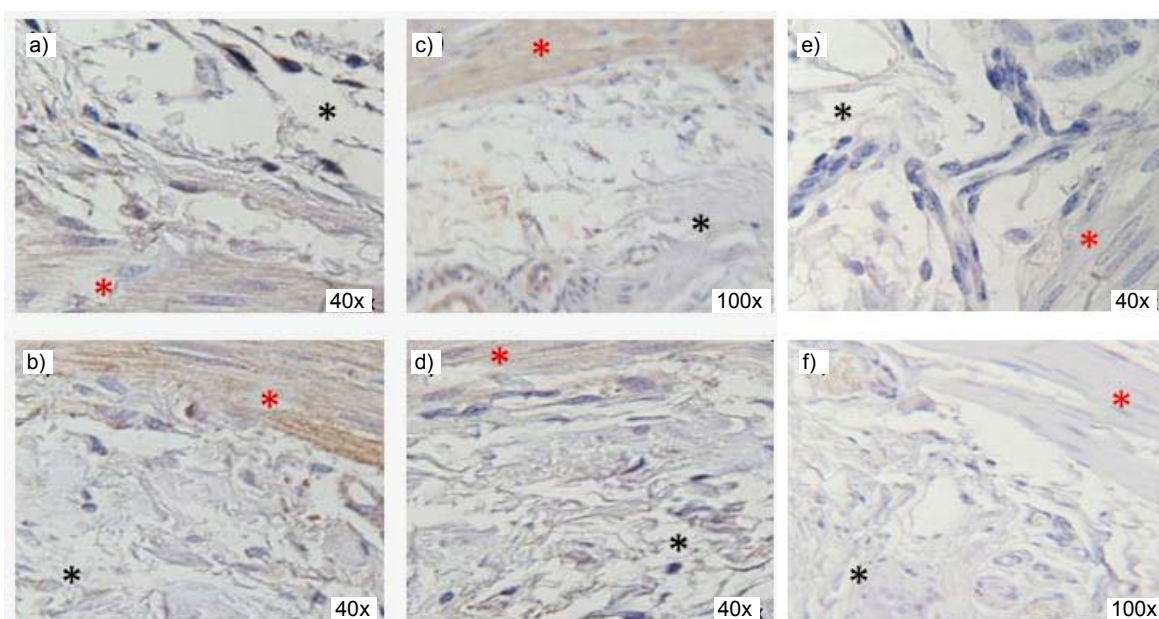


Figura 12. **Expresión de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en la pared de la tráquea.** En los paneles superiores se observa la expresión del dominio citosólico (a, c y e) y en los inferiores el extracelular (b, d y f). Los cobayos controles corresponden a los paneles a) y b) y en del modelo de asma c) y d). En asteriscos rojos y negros se señala la banda de músculo liso y de tejido conectivo (adventicia), respectivamente. En los paneles e) y f) se observan los controles negativos, es decir, aquellos tejidos a los que no se les trató con anticuerpo primario, pero sí con el anticuerpo secundario, esto para observar si no hay marca inespecífica del anticuerpo secundario.

8. Expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo y músculo liso traqueal mediante microscopía electrónica.

Mediante microscopía electrónica se localizó la expresión del dominio extracelular (flechas rojas) y citosólico (flechas amarillas) de la subunidad $\beta 1$ de integrina en músculo liso traqueal y sobre fibras de colágena de las VA de cobayos controles y del modelo de asma alérgica (Fig. 13). Nótese que no sólo la expresión del dominio extracelular, sino también del dominio citosólico se encuentran sobre la MEC del intersticio.

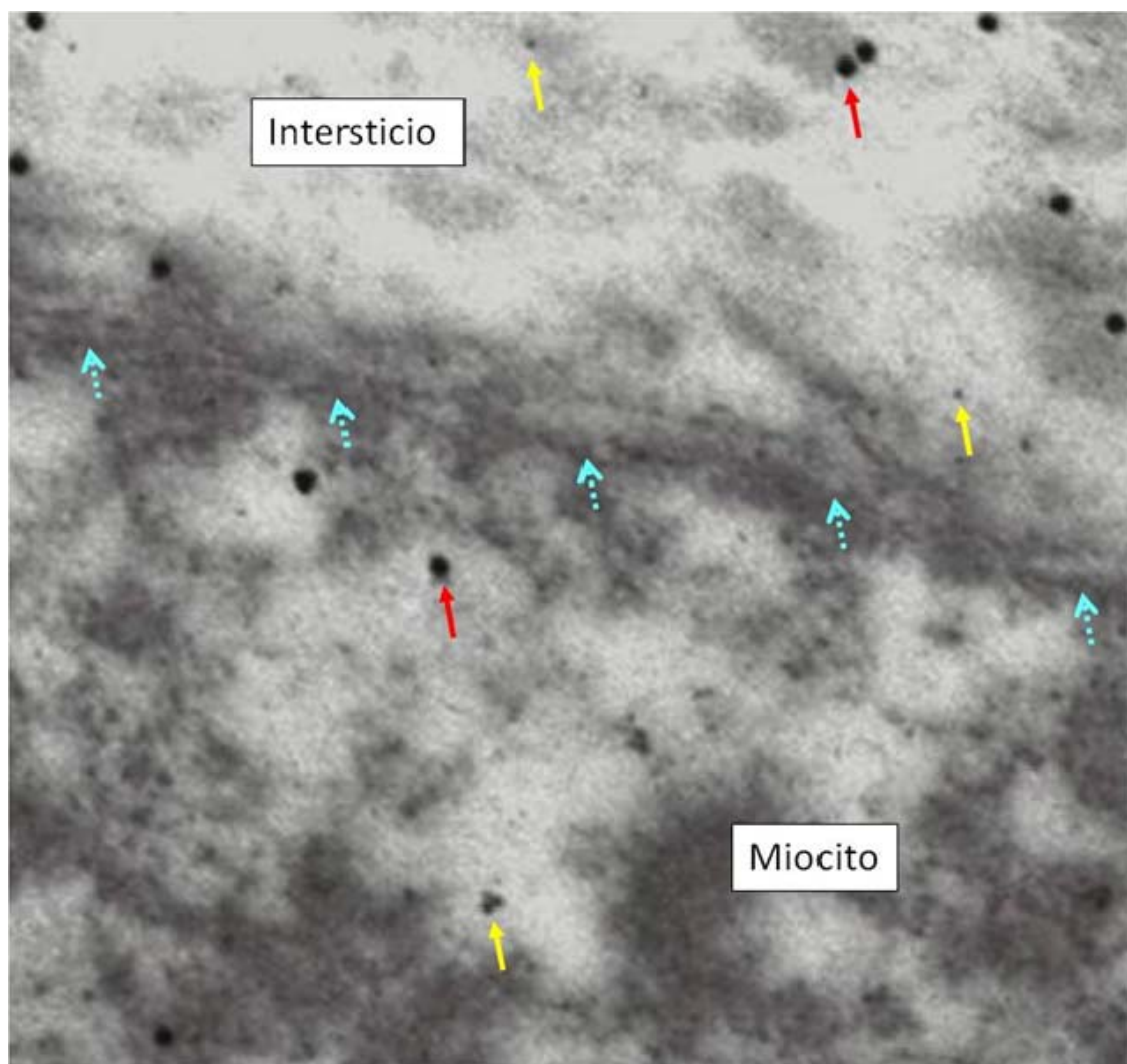


Figura 13. **Micrografía representativa de la expresión del dominio extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en un modelo de asma alérgica en el cobayo.** La inmunoreactividad para los dominios extracelular (flechas rojas) y citosólico (flechas amarillas) de la subunidad $\beta 1$ de integrina fue detectada con anticuerpos marcados con oro coloidal (puntos grandes y pequeños, respectivamente). Las flechas azules indican el borde de la membrana plasmática de una célula de músculo liso traqueal. Magnificación x12,000.

9. Expresión semicuantitativa de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo traqueal.

En el tejido conectivo obtenido en la adventicia de la tráquea tanto de los cobayos controles como los del modelo de asma se identificaron 5 bandas (>220, 220, 130, 120 y 110 kDa) con el anticuerpo dirigido contra el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina. Particularmente la expresión de la proteína >220 kDa fue significativamente mayor en el modelo de asma que en los controles ($P < 0.05$). Una sexta banda de 60 kDa fue observada pero en los animales del modelo de asma. Con respecto al dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, se identificaron 5 bandas (220, 130, 120, 110 y 60 kDa) tanto en los cobayos control como los del modelo de asma. La expresión de las bandas de 220, 130 y 60 kDa aumentó significativamente ($P < 0.01$) mientras que la de 110 kDa disminuyó ($P < 0.05$) en los cobayos del modelo de asma respecto a los controles. Una sexta banda de 70 kDa identificada con el anticuerpo extracelular de la integrina fue observada sólo en los cobayos del modelo de asma (Fig. 14).

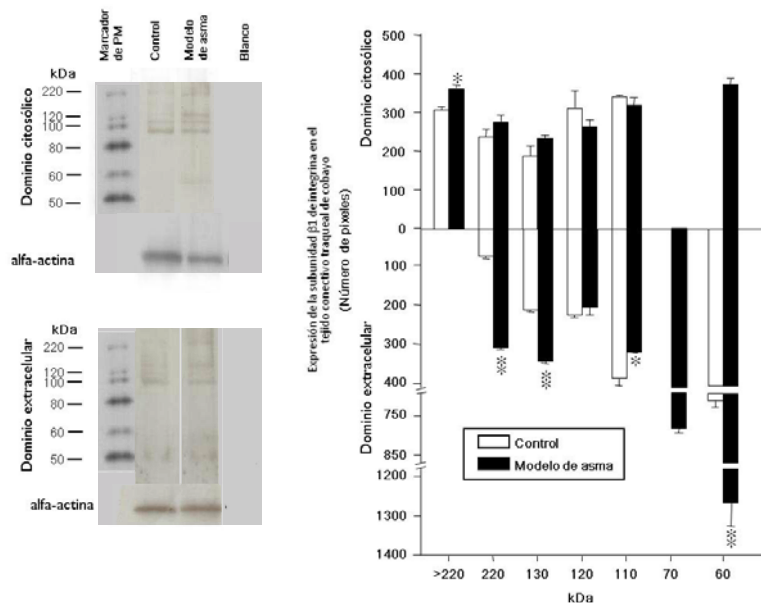


Figura 14. Expresión semicuatitativa de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el tejido conectivo traqueal en un modelo de asma alérgica en el cobayo. Western blot representativo de tres repeticiones. El blanco nos indica que no hay marca inespecífica de los anticuerpos empleados para la identificación de la proteína. Comparaciones entre control y modelo de asma. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$, prueba t de Student. Las barras corresponden a promedios \pm error estándar. $n = 3$ respectivamente para control y modelo de asma.

10. Relación de la expresión entre los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo traqueal de cobayo.

La relación entre la expresión del dominio citosólico con respecto al extracelular de las proteínas 220, 130, 120, 110 y 60 kDa, que fueron las que expresaron ambos dominios de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo se muestra en la figura 15. En los controles, la relación entre ambos dominios no mostró diferencias estadísticamente significativas para las bandas 130, 120 y 110 kDa. La banda de 60 kDa no se observó en el control, mientras que la de 220 kDa mostró un incremento en la expresión del dominio citosólico con respecto al extracelular ($P < 0.05$). En el modelo de asma, las bandas de 130 y 60 kDa aumentaron su expresión del dominio extracelular en comparación con el citosólico ($P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente; Fig. 15); y hubo un incremento de la banda de 120 kDa citosólica con relación a la extracelular ($P < 0.05$). Finalmente, la relación entre los dominios de los animales del modelo de asma fue significativamente menor que la de los controles para la proteína de 220 kDa ($P < 0.01$; Fig. 15).

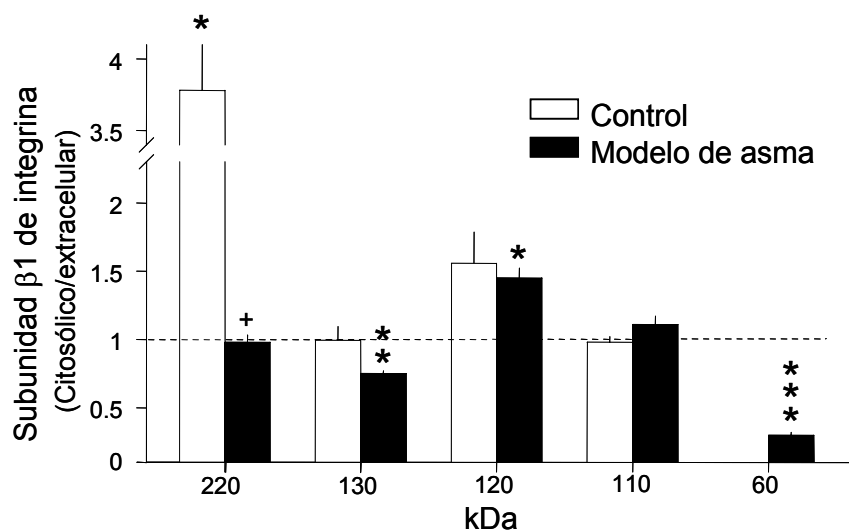


Figura 15. Relación de la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en tejido conectivo de tráquea en un modelo de asma alérgica. $n = 3$ respectivamente para control y modelo de asma. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ para las comparaciones entre la expresión del dominio citosólico en relación con el extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, prueba de t de Student pareada. + $P < 0.01$ comparado con el control (prueba no pareada de t de Student). Las barras corresponden a promedios \pm error estándar.

11. Expresión de los distintos polipéptidos de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos y tejido conectivo traqueal en un modelo de asma alérgica.

En la tabla 3 se muestra la distribución de los distintos polipéptidos que se identificaron por medio de western blot en el tejido conectivo y músculo liso traqueal. La expresión simultánea del dominio citosólico y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el músculo liso y tejido conectivo involucró las bandas correspondientes a 220, 130 y 110 kDa tanto para cobayos del modelo de asma como controles. En 220 kDa de tejido conectivo así como 130 y 110 kDa de los miocitos hubo una tendencia a la mayor expresión del dominio citosólico. En la banda de 220 kDa de los miocitos y 130 kDa de tejido conectivo, la tendencia fue al incremento de la expresión del dominio extracelular (tabla 3). Por otro lado, el dominio citosólico se expresó tanto en los controles como en el modelo de asma en las proteínas de peso de 170 y 120 kDa de los miocitos y >220 kDa del tejido conectivo. De hecho en 170 kDa de miocito y >220 kDa del tejido conectivo, la expresión del dominio citosólico disminuyó y aumentó, respectivamente, en el modelo de asma en comparación al control (Figs. 14-15, tabla 3). En el caso de las banda 80, 75 y 50 kDa de los miocitos, la expresión del dominio citosólico se observó solo en los cobayos del modelo de asma. La proteína de 60 kDa expresó tanto el dominio extracelular como citosólico solo en miocitos; mientras que en tejido conectivo la banda de 120 kDa expresó ambos dominios, aunque con una tendencia al citosólico en el modelo de asma (Figs. 12-15; tabla 3). La expresión del dominio extracelular fue observado únicamente para el caso de la proteína de 70 kDa en miocitos tanto controles como del modelo de asma, y en tejido conectivo en el modelo de asma. La expresión del dominio extracelular también se observó en el caso de la proteína de 60 kDa en los controles del tejido conectivo, pero en el modelo de asma, la proteína de 60 kDa mostró tanto el dominio

citoplasmático como el extracelular, con una tendencia a la mayor expresión del extracelular (Figs. 14 y 15, tabla 3).

Tabla 3. Expresión de diferentes polipéptidos del dominio citoplasmático y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en miocitos y tejido conectivo traqueal en un modelo de asma alérgica.

kDa	Miocitos		Tejido conectivo	
	Control	Asma	Control	Asma
>220			C	↑C
220	CE	CE ↑E*	CE	CE ↑C*
170	C	↓C		
130	CE	CE ↑C*	CE	CE ↑E*
120	C	C	CE	CE ↑C*
110	CE	CE ↑C*	CE	CE
80		C		
75		C		
70	E	E		E
60	CE	CE	E	CE ↑E*
50		C		

C y E corresponden a la expresión del dominio citoplasmático y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina respectivamente. La flecha ↑ representa que hay un incremento en la expresión del dominio según sea el caso, mientras que la flecha ↓ corresponde a una disminución en la expresión del dominio correspondiente. El asterisco señala aquellos valores obtenidos de la relación de expresión del dominio citoplasmático en comparación con el extracelular.

DISCUSIÓN

La característica más consistente del asma es la hiperreactividad de las VA ante diferentes estímulos (Cockroft, 2006). Aunque el mecanismo asociado a la generación de hiperreactividad de las VA aún se desconoce, se ha propuesto que la inflamación y la remodelación de las VA podrían asociarse a su desarrollo (O'Byrne, 2003). En este estudio se observó que la hiperreactividad de las VA inducida por el modelo de asma podría estar asociada con cambios en la expresión de proteínas en los miocitos como la subunidad $\beta 1$ de integrina y el TGF- $\beta 1$.

Entre todos los tipos de adhesinas celulares, las integrinas constituyen los principales "sensores" de la MEC, pues son importantes transductores de señales de componentes de matriz como fibronectina, colágena, laminina, entre otros (Hynes, 2002). Aunque se sabe que en el asma los componentes de la MEC se modifican, poco se sabe sobre los cambios de expresión de integrinas durante este padecimiento.

Recientemente, utilizando el mismo modelo de asma en el cobayo que en el presente trabajo, se describió que hay un incremento significativo en la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en zonas acelulares de la MEC y en las bandas de músculo liso de la pared de la VA. En ese mismo estudio se observó que la expresión de esta subunidad de integrina se relaciona directamente con varios aspectos fisiopatológicos del asma como la inflamación, la fibrosis y el grado de hiperreactividad de las VA (Bazán-Perkins et al, 2009). Una limitación de dicho estudio es que no se pudo determinar si la integrina de la banda de músculo era celular, esto es si estaban en los miocitos, o acelular y se encontraba en los intersticios.

El MLVA es el principal controlador del tono de la VA y actor central del desarrollo de la hiperreactividad de las VA. Durante la contracción, en el MLVA se orquestan gran cantidad de eventos asociados con el rearrreglo de las proteínas del citoesqueleto que forman parte de los multidominios que están en contacto con las uniones focales, donde las integrinas son el eje central (Kim et al, 2011). En

consecuencia, las integrinas potencialmente podrían ser primordiales en el desarrollo de la contracción e hiperreactividad de las VA, situación que ha sido confirmada por varios autores (Abraham et al, 2004; Dekkers et al, 2009; Huang et al, 2010). No obstante, en el presente trabajo determinamos que la expresión sólo del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina es la que se relaciona con el desarrollo de hiperreactividad de las VA en el modelo de asma en el cobayo.

Funcionalmente, el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina tiene acoplada importantes vías de señalización mediante varias proteínas de andamiaje como talina, paxilina, vinculina, filamina y la cinasa ligada a integrinas (Billadeau et al, 2007). En este sentido, en el modelo de asma utilizado en este trabajo observamos la expresión de varios fragmentos que contenían solo el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina (50, 75, 80, 120 y 170 kDa), que salvo por los de 120 y 170 kDa, no se revelaron en el control. Algunos estudios han sugerido que los fragmentos citosólicos podrían estar asociados a diferentes patologías. Por ejemplo, en miocitos ventriculares los fragmentos que contienen el dominio citosólico de la integrina $\beta 1$ se generan durante la apoptosis inducida por la hipertrofia cardiaca (Menon et al, 2006). Adicionalmente, en células NIH-3T3 los fragmentos citosólicos de la subunidad $\beta 1$ de integrina están involucrados en la activación de la fosfolipasa A2 cuya expresión se induce en condiciones patológicas (Whitfield and Jacobson, 1999). Esto sugiere que los fragmentos que contienen el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina en los miocitos podrían generarse en el asma y regular la señalización celular, y probablemente por este mecanismo, modificar la reactividad de la VA.

El mecanismo por el cual se pudieron generar los fragmentos 50, 75, 80, 120 y 170 kDa que contenían solo el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina podría haber sido mediante empalme alternativo ya que se ha descrito que un solo gen codifica para esta proteína, aunque no se puede descartar que se haya producido por corte proteolítico (Mara et al, 1997; Takada et al, 2007; von der Mark et al, 2002). En este escenario, es importante indicar que este modelo de asma en el cobayo induce la

acumulación del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina sobre la colágena que rodea la banda de músculo liso (Bazan-Perkins et al, 2009), y de hecho, observamos un fragmento de 70 kDa que solo tenía el dominio extracelular tanto en los cobayos control como los del modelo de asma. Esto sugiere que es probable que algunos de los fragmentos de integrina $\beta 1$ que contienen el dominio citosólico probablemente se generaron por corte proteolítico.

Otro mecanismo que puede inducir cambios en el peso molecular de una proteína es la presencia de glicosilaciones y fosforilaciones. Se sabe que la subunidad $\beta 1$ de integrina tiene 12 sitios donde puede ser glicosilada y 2 sitios potenciales para ser fosforilada (Scott et al, 1987). Posiblemente estas modificaciones se están presentando en la subunidad $\beta 1$ de integrina y por esta razón estamos encontrando muchas variaciones en los pesos moleculares, sin embargo es importante que en un estudio futuro se analice la secuencia de los polipéptidos encontrados para determinar qué tipo de modificaciones presentan y finalmente relacionarlos con los procesos fisiopatológicos del asma.

Nuestros resultados mostraron también que algunos polipéptidos de la subunidad $\beta 1$ de integrina que se expresaron en los miocitos (220, 130, 110 y 60 kDa), fueron revelados por ambos anticuerpos, esto es, el del dominio citosólico y el del extracelular. Es de llamar la atención que estas proteínas no modificaron su expresión en el modelo de asma salvo la de 110 kDa, que tuvo una tendencia a incrementar la expresión del dominio citosólico en comparación al extracelular en el modelo de asma. Se sabe que la forma madura (glicosilada) de la subunidad $\beta 1$ de integrina tiene un peso molecular aproximado de 130 kDa, y que la de 110 kDa corresponde a la forma inmadura que no se ha glicosilado (Dedhar et al, 1992). Es probable que un polipéptido de 110 kDa que no expresa el epítipo para el dominio extracelular, o que lo tiene oculto, se esté revelando en los cobayos del modelo de asma.

Un resultado controversial es la presencia de los polipéptidos de integrina de alto peso molecular, como el de 220 kDa encontrado en los miocitos. En una línea celular

de cáncer de próstata se han observado este tipo de polipéptidos (225 kDa) y se demostró que se producen porque en el western blot se están evidenciando dímeros $\alpha\beta$, particularmente el heterodímero $\alpha3\beta1$ (Dedhar et al, 1992). Entonces es probable que en el cobayo el polipéptido de 220 kDa sea un dímero $\alpha\beta$, sin embargo se necesitan hacer más estudios para demostrarlo.

Un hallazgo interesante del presente estudio es la estrecha asociación en los miocitos entre la expresión de la subunidad $\beta1$ de integrina (ambos dominios) con el TGF- $\beta1$. Una posible explicación para esta asociación es que se ha visto que la expresión de integrinas $\beta1$ es modulada directamente por el TGF- $\beta1$ (Bottoms, 2010; Bran et al, 2010; Fong et al, 2009; Warstat et al, 2010). El TGF- $\beta1$ es una proteína multifuncional con importantes funciones inmunoregulatoras en la inflamación. Sin embargo, el papel del TGF- $\beta1$ en el asma es controversial. Por un lado se ha descrito que el TGF- $\beta1$ suprime el desarrollo del asma y reactividad (Alcorn et al, 2007; Burchell et al, 2009), pero por otro también se ha observado que durante el desarrollo del asma y la hiperreactividad de las VA hay un incremento en la expresión de TGF- $\beta1$ (Ozyilmaz et al, 2009; Wakahara et al, 2008). En este trabajo observamos que el incremento en la expresión TGF- $\beta1$ en el MLVA del cobayo esta relacionado con la magnitud de hiperreactividad de las VA. Esto sugiere que probablemente esta desarrollando un fenotipo de miocito diferente en el del modelo del asma, y que este fenotipo esta asociado con el incremento de la hiperreactividad de las VA.

Una citocina que podría asociarse al fenotipo de miocito involucrado en el incremento de la hiperreactividad de las VA es la IL-13 debido a que es una de las principales citocinas en la regulación de muchos eventos en el asma (Wills-Karp et al, 1998). No obstante, la expresión de esta citocina en los miocitos no se modificó en el modelo de asma en el cobayo ni se observó ninguna asociación entre esta citocina con la hiperreactividad de las VA ni expresión de la subunidad $\beta1$ de integrina o el TGF- $\beta1$.

Finalmente, en un estudio previo se había sugerido la presencia de polipéptidos de subunidad $\beta 1$ en la MEC en el modelo de asma de los cobayos (Bazán-Perkins, 2009). Nuestros resultados corroboran la presencia del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina sobre la MEC de manera acelular, pero también se pudo corroborar por microscopía electrónica la expresión del dominio citosólico. Hasta el momento, se han identificado 188 proteínas que presentan un solo dominio transmembranal, de manera soluble o acelular, por lo que este proceso es cada vez más común (Yi Xing et al, 2003). Es probable que las integrinas también presenten esta característica como lo sugieren los resultados del presente trabajo.

En el presente estudio observamos que prácticamente todos los polipéptidos encontrados en la MEC también se observaron en los miocitos, pero sorprendentemente un polipéptido de gran peso molecular, el de >220 kDa no se observó a nivel celular. Es probable que alguna proteína se encuentre unida a este polipéptido en miocitos pero necesitan más estudios para corroborarlo.

En conclusión, los distintos polipéptidos de la subunidad $\beta 1$ de integrina encontrados en el MLVA podrían estar modulando múltiples funciones celulares, pues se ha visto que los fragmentos de proteínas pueden conservar sus propiedades y controlar la expresión de otras proteínas (Mara, 1997).

CONCLUSIONES

1. En el modelo de asma hay un incremento en la expresión del dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina y del TGF- $\beta 1$ en los miocitos traqueales.
2. Es probable que la hiperreactividad de las VA se desarrolle en un fenotipo de miocitos que sobreexpresan el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina y TGF- $\beta 1$.
3. Algunas variantes que contienen el dominio citosólico de la subunidad $\beta 1$ de integrina no sólo se encuentran en los miocitos, sino también las observamos de forma acelular sobre la MEC.

REFERENCIAS

1. Abraham W., Serebriakov I., Carmillo A., Ferrant J., de Fougerolles A., Garber A., Gotwals J., Kotliansky E., Taylor F. and Lobb R. **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. Alcorn F., Rinaldi M., Jaffe F., van Loon M., Bates H., Janssen-Heininger M., Irvin G., Alessio D., Rafia S., Jhon R., Bradley S. and Jordan S. **Transforming growth factor-beta 1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(10): 974-82.
3. Barczyk M. and Carracedo S. **Integrins.** *Cell Tissue Res* 2010; 339: 269-280.
4. Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Vargas MH., Martínez-Cordero E., Ramos-Ramírez P., Alvarez-Santos M., Hiriart G., Gaxiola M. and Hernandez-Pando R. **Beta1-integrina shedding in a guinea pig model of chronic asthma with remodelled airways.** *Clin Exp Allergy* 2009; 39(5): 740-751.
5. Bazán-Perkins B., Segura P., González-Juárez F. Capítulo 15: **Asma, en Diagnóstico y tratamiento en neumología.** Primera edición. Ed. Manual Moderno. 626p. ISBN 9789707293465 Pág. 241-262 (2008).
6. Billadeau D. D., Nolz J. C. and Gomez T. S. **Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton.** *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 131-143.
7. Bottoms S.E., Howel J.E., Reinhardt A.K., Evans I.C. and McAnulty R.J. **TGF-beta isoform specific regulation of airway and remodeling in a murine model of asthma.** *PLOS one* 2010; 5(3): e9674.
8. Boudreau J. P. **Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come.** *Biochem J* 1999; 339: 481-488.
9. Bran G.M., Sommer U.J., Goessler U.R., Hormann K., Riedel F. and Sadick H. **TGF-beta 1 antisense impacts the SMAD signaling system in fibroblasts from keloid scars.** *Anticancer Res* 2010; 30(9): 3459-63.
10. Busse W. **The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation.** *CHEST* 2010; 138(2): 4S-10S.
11. Cockcroft D. and Davis E. **Mechanisms of airway of hiperresponsiveness.** *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(3): 551-559.
12. Dabelsteen E. and Gao S. **ABO blood-group antigens in oral cancer.** *SAGE publications* 2005; 84(1): 21-8.
13. Dedhar S., Gray V., Robertson K. and Saulnier R. **Identification and characterization of a novel high-molecular-weight form of integrin $\alpha 3$ subunit.** *Exp Cell Research* 1992; 203: 270-275.

14. Dekkers G., Bos S., Gosens R., Halayko J., Zaagsma J. and Meurs H. **The integrin-blocking peptide RGDS inhibits airway smooth muscle remodeling in a guinea pig model of allergic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(6): 556-65.
15. Deng J., Brautigan D., Eto M. and Walsh M. **Phosphorilation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase.** *J Biochem* 2002; 367: 517-524.
16. Desmond M. and O'Byrne. **Recent advances in the pathophysiology of asthma.** *CHEST* 2010; 137(6): 1417-1426.
17. Dmitri V., Amelia K., Tillie L., Joanne B., Furquan S., Philip J., Victor J. and Darryl A. **Transforming growth factor β 1 induces α β 3 integrin expression in human lung fibroblasts via a β 3 integrin-, c-Src-, and p38 MAPK-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2008; 283(19): 12898-12908.
18. Eiko H., Koji Y. and Hiroshi M. **Transforming growth factor- β upregulates the expression of integrin and related proteins in MRC-5 human myofibroblasts.** *J Exp Med* 2010; 220: 319-327.
19. Fong C., Hsu F., Wu L., Li M., Kao T., Tsai J., Chen C., Liu C., Wu M. and Tang H. **Transforming grow factor beta 1 increases cell migration and beta 1 integrin up regulation in human lung cancer cells.** *Lung cancer* 2009; 64(1): 13-21.
20. Pelaia G., Renda T., Gallelli L., Vetrella A., Busceti M. T., Agati S., Caputi M., Cazzola M., Maselli R. and Serafino A. **Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma.** *Respir med* 2008; 102: 1173-1181.
21. Gunst J. and Tang D. **The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle.** *Eur Respir J* 2000(15): 600-616.
22. Hannigan G., Fitz-Gibbon L. Coppolino M., Radeva G. and Filmus J. **Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β 1 integrin linked protein kinase.** *Nature* 1996; 379: 91-96.
23. Hemler M.E. **Adhesive protein receptors on hematopoietic cells.** *Immunol Today* 1988; 9: 109-113.
24. Hemler, M.E. **VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes.** *Annual Review Immunol* 1990; 8: 365-400.
25. Holgate S. T. **A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis.** *Allerg Asthma Immunol Res* 2010; 2(3): 165-171.

26. Huang Y., Zhang W. and Gunst S. **Activation of vinculin induced by cholinergic stimulation regulates contraction of tracheal smooth muscle tissue.** *J Biol Chem* 2010; 283 (5): 365-373
27. Humphries M.J. **Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism.** *Tren in Pharmacolo Sci* 2000; 21: 29-32.
28. Hynes R.O. **Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines.** *Cell* 2002; 110: 673-687.
29. Hynes, R.O. **Integrins: a family of cell surface receptors.** *Cell* 1987; 48: 549-550.
30. Krähling H., Mally S., Eble J. A., Noël J., Schwab A. and Stock C. **The glycocalyx maintains a cell surface pH nanoenvironment crucial for integrin-mediated migration of human melanoma cells.** *Eur J Physiol* 2009; 458: 1069-1083.
31. Kreidberg J. and Symons J. **Integrins in kidney development, function, and disease.** *Amer J of Physiol* 2000; 279: F233-F242.
32. Kim H., DeKruyff R. and Umetsu D. **The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity.** *Nat Immunol* 2010; 11(7): 577-84.
33. Kim R., Appel S., Vetterkind S., Gangopadhyay S. and Morgan G. **Smooth muscle signaling pathways in health and disease.** *J Cell Mol Med* 2008; 12(6A): 2165-2180.
34. Kim J., Jain D., Tliba O., Yang B., Jester W., Panettieri R., Amrani Y. and Pure E. **TGF-beta potentiates airway smooth muscle responsiveness to bradykinin.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(4): L511-20.
35. Kim Y., DeKruyff H. and Umetsu T. **The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity.** *Nat Immunol* 2010; 11(7): 577-84.
36. Kim R., Liu K., Roberts J. and Hai M. **Length-Dependent Modulation of Cytoskeletal Remodeling and Mechanical Energetics in Airway Smooth Muscle.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; (en prensa)
37. Liu S. **Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.** *J Cell Sc.* 2000; 113: 3563-3571.
38. Lloyd C. and Hessel M. **Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells.** *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 838-848.
39. Mara F. and Languino R. **Alternatively spliced variants: a new view of the integrin cytoplasmic domain.** *Mat Biol* 1997; 16: 185-193.
40. Menon B., Krishnamurthy P., Kaverina E., Johnson N., Ross S., Singh M. and Singh K. **Expression of the cytoplasmic domain of beta1 integrin induces apoptosis in adult rat ventricular myocytes (ARVM) via the involvement of**

- caspase-8 and mitochondrial death pathway.** *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 485-493.
41. Nguyen T., Ward P. and Hirst J. **β 1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 114: 2553-2560.
 42. O'Byrne **Airway hyperresponsiveness.** *Chest* 2003; 123: 411S-416S.
 43. Ozyilmaz E., Canbakan S., Capan N., Erturk A. and Gulhan M. **Correlation of plasma transforming growth factor beta 1 with asthma control test.** *Allerg Asthma Proc* 2009; 30(1): 35-40.
 44. Peng Q., Nguyen T., Chan V., Matsuda T. and Hirst J. **β 1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen.** *J Immunol* 2005; 174: 2258-2264.
 45. Pytela R., Pierchbacher M. and Ruoslahti E. **Identification and isolation of a 140 kD cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor.** *Cell* 1985; 40: 191-198.
 46. Rodger W. **Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle.** *Br. J. Clin. Pharmacol* 1985; 20: 255S-266S.
 47. Ruoslahti E. **Integrin signaling and matrix assembly.** *Tumor Biology.* 1995; 17: 117-124.
 48. Takada Y., Ye X. and Simon S. **The integrins.** *Genom Biol* 2007; 8: 215.
 49. The Global Burden of Asthma Report. GINA 2007. Página electrónica: www.ginasthma.org
 50. Vargas M. H. (2005) **Patogenia del asma. En: Asma. Enfoque integral para latinoamérica.** México: McGraw-Hill Interamericana.
 51. Ville CA. (1996) **Biología.** México: McGraw-Hill Interamericana.
 52. Viniegra Osorio A. (2010) **Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del asma.** Instituto Mexicano del Seguro Social.
 53. Von Der Mark H., Williams I., Wendler O., Sorokin L., von Der Mark K. and Poschl E. **Alternative splice variants of alpha 7 beta 1 integrin selectively recognize different laminin isoforms.** *J Biol Chem* 2002; 277(8): 6012-6016.
 54. Wakahara K., Tanaka H., Takahashi G., Tamari M., Nasu R., Toyohara T., Takano H., Saito S., Inagaki N., Shimokata K. and Nagai H. **Repeated instillations of dermatophagoides farinae into airways can induce Th-2 dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodelling in mice: effect on intratracheal treatment of fluticasone propionate.** *Eur J Pharmacol* 2008; 578(1): 87-96.

55. Warstat K., Meckbach D., Weis-Klemm M., Hack A., Klein G., de Zwart P. and Aicher K. **TGF-beta enhances the integrin alpha2 beta1-mediated attachment of mesenchymal stem cells to type I collagen.** *Stem Cells Dev* 2010; 19(5): 645-656.
56. Welsch U. (2008) **Histología.** España: Editorial médica panamericana.
57. West, JB. (2002) **Fisiología respiratoria.** Argentina: Editorial médica panamericana.
58. Whitfield A. and Jacobson S. **The beta1-integrin cytosolic domain optimizes phospholipase A2-mediated arachidonic acid release required for NIH-3T3 cell spreading.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 306-312.
59. Ying S., Gu S. and Zhao J.. **How much do we know about atopic asthma: where are we now?** *Cell and Mol Immunol* 2006; 3: 321-332.
60. Chiba Y., Onoda S., Todoroki M., Nishida Y. and Misawa M. **Upregulation of interleukin-13 receptor chains in bronchial smooth muscle tissues of mouse experimental asthma.** *J Smooth Muscle Res* 2010; 46(1): 49-55.