



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Relación entre la expresión de integrinas
solubles con la hiperreactividad y la
inflamación de las vías aéreas en un modelo
de asma alérgica en el cobayo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Maryana Tinoco Cuéllar



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos**

México 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno (a)

Apellido paterno	Tinoco
Apellido materno	Cuéllar
Nombre (s)	Maryana
Teléfono	5751 3813
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	30419618-6

2.- Datos del tutor (a)

Grado	M. en C.
Nombre (s)	Mayra Dinorah
Apellido paterno	Álvarez
Apellido materno	Santos

3.- Datos del sinodal 1

Grado	Dra.
Nombre (s)	Norma Araceli
Apellido paterno	Bobadilla
Apellido materno	Sandoval

4.- Datos del sinodal 2

Grado	Dra.
Nombre (s)	Pilar
Apellido paterno	Durán
Apellido materno	Hernández

5.- Datos del sinodal 3

Grado	Dr.
Nombre (s)	Ricardo
Apellido paterno	Lascurain
Apellido materno	Ledesma

6.- Datos del sinodal 4

Grado	Dra.
Nombre (s)	Blanca Margarita
Apellido paterno	Bazán
Apellido materno	Perkins

7.- Datos del trabajo escrito

Título	“Relación entre la expresión de integrinas solubles con la hiperreactividad y la inflamación de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.”
Número de páginas	54 páginas
Año	2012

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

ASESOR

M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos

SUSTENTANTE

Maryana Tinoco Cuéllar



Este trabajo se realizó en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), bajo la asesoría de la M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos y como responsable y asesor por parte del INER de la Dra. Blanca M. Bazán Perkins. Con el apoyo de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales mediante el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI).

AGRADECIMIENTOS

- A mi mamá Ana María Cuéllar y a mi papá José Tinoco, esto es solamente un pedacito de la forma en que puedo pagar el apoyo incondicional que siempre me han brindado. Son un ejemplo para mí de amor, fuerza, lucha y dedicación.
- A mi familia, de quienes nunca faltó apoyo o una palabra de aliento.
- A Enrique, que ha estado conmigo en todo momento y me ha ayudado a levantarme en los momentos difíciles.
- A mi tutora M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos, por su tiempo y apoyo no sólo en cuestiones de trabajo, sino como amiga.
- A la Biol. Patricia Ramos, por su paciencia y por la ayuda en la metodología de este trabajo.
- A la Dra. Blanca Bazán Perkins, por la oportunidad, la enseñanza, el tiempo y las palabras que me brindó.
- A la Dra. Blanca Bazán, Dra. Norma Bobadilla, Dra. Pilar Durán y al Dr. Ricardo Lascurain, por ser miembros del jurado y por sus grandes aciertos en los comentarios de este trabajo.
- A la Dra. Patricia Segura, a la Química Juanita Arrellano, de quienes siempre tuve apoyo y consejos durante mi estancia en el laboratorio.
- A los estudiantes del equipo de trabajo en el laboratorio, Biol. Fernando Gutiérrez, Guadalupe Córdoba, Biol. Patricia Ramos, Biol. Olivia Téllez Jiménez y Biol. Teresa, quienes también han sido maestros para mí.
- A Toñita y a Lalo, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en las largas horas de laboratorio.
- Al INER y a PROBEL, por las facilidades dadas en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1 INTRODUCCIÓN	11
1.1 Vías Aéreas.....	11
1.2 Asma.....	12
1.3 Fisiopatología del asma.....	13
1.4 Hiperreactividad de las vías aéreas.....	15
1.5 Broncoobstrucción.....	16
1.6 Inflamación de las vías aéreas.....	16
1.7 Modelo de asma.....	17
1.8 Integrinas.....	18
1.9 Subunidad β 1 de integrina.....	20
1.10 Subunidad β 2 de integrina.....	21
1.11 Receptores solubles.....	22
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
3 HIPÓTESIS.....	24
4 OBJETIVOS.....	24
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
5.1 Animales.....	26
5.2 Sensibilización Antigénica.....	26
5.3 Pletismografía barométrica.....	27
5.3.1 Refuerzo Antigénico.....	27
5.4 Retos antigénicos.....	29
5.5 Reactividad de las vías aéreas.....	30
5.6 Conteo total y diferencial en el lavado broncoalveolar.....	30
5.7 Obtención de suero.....	31
5.8 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	31
5.9 Análisis Estadístico.....	32
6 RESULTADOS.....	34
6.1 Tipo de respuesta.....	34
6.2 Reactividad de las vías aéreas.....	35
6.3 Conteo celular total y diferencial en lavado broncoalveolar.....	36
6.4 Expresión de la forma soluble de la subunidad β 1 de integrina.....	38
6.5 Relación de la expresión entre la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad β 1 de integrina en sobrenadante de LBA y suero.....	39
6.6 Expresión de la forma soluble de la subunidad β 2 de integrina.....	40

6.7 Relación de la expresión entre la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.....	41
6.8 Relación entre la inflamación y la magnitud de la reactividad de la VA con la expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina.....	42
7 DISCUSIÓN.....	44
8 CONCLUSIONES.....	49
9 REFERENCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Características anatómicas de las vías aéreas.
- Figura 2.** Respuesta inflamatoria en las vías aéreas durante el asma.
- Figura 3.** Curva dosis-respuesta ante concentraciones crecientes de metacolina, indicando la caída del volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV₁).
- Figura 4.** Migración de leucocitos en las vías aéreas.
- Figura 5.** Superfamilia y estructura de integrinas humanas.
- Figura 6.** Representación de la subunidad β de integrina.
- Figura 7.** Mecanismos de acción de los receptores solubles.
- Figura 8.** Esquema que muestra el proceso de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica.
- Figura 9.** Parámetros obtenidos por pletismografía barométrica.
- Figura 10.** Respuesta de cobayos sensibilizados a la ovoalbúmina.
- Figura 11.** Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica aguda y crónica.
- Figura 12.** Conteo celular total y diferencial en un modelo de asma alérgica aguda y crónica.
- Figura 13.** Expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en las muestras de sobrenadante de LBA y suero.
- Figura 14.** Relación entre la expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.
- Figura 15.** Expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en muestras de sobrenadante de LBA y de suero.
- Figura 16.** Relación entre la expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.

- Tabla 1.** Coeficientes de correlación entre el tipo celular infiltrado en las vías aéreas con la presencia de la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y de suero.
- Tabla 2.** Coeficientes de correlación entre el tipo celular infiltrado en las vías aéreas con la presencia de la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y de suero.
- Tabla 3.** Coeficientes de correlación entre el grado de hiperreactividad de las vías aéreas con la presencia de la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y de suero.
- Tabla 4.** Coeficientes de correlación entre el grado de hiperreactividad de las vías aéreas con la presencia de la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y de suero.

RESUMEN

El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por un proceso inflamatorio y de hiperreactividad de las vías aéreas (HVA). Durante el asma, las células inflamatorias son retenidas y reclutadas hacia las vías aéreas (VA) debido a la expresión de diversos mediadores y de moléculas de adhesión celular. Las integrinas son moléculas de adhesión implicadas en la migración y activación de células inflamatorias hacia el tejido pulmonar y se considera que tienen un papel importante en la patología del asma. Recientemente, se ha propuesto la participación de variantes no unidas a células de las integrinas en diversos procesos fisiológicos y patologías. Por ejemplo, recientemente se describió en un modelo de asma alérgica en cobayo, que la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina no unida a células pero adherida a la matriz extracelular se relaciona directamente con la magnitud de la HVA e inflamación de las VA. Por otro lado, las integrinas que poseen la subunidad $\beta 2$, que son indispensables para la migración de los leucocitos, han sido observadas también no unidas a células en muchas patologías, pero no en el asma. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de la forma no unida a células de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina en LBA y suero (formas solubles), en un modelo de asma alérgica en cobayo y correlacionar su expresión con el infiltrado celular y la HVA. Para esto, cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH se sensibilizaron a ovoalbúmina (OVA) y se retaron al antígeno cada diez días. Mediante pletismografía barométrica se evaluó el cambio en el índice de broncoobstrucción (iB), obteniendo dos grupos de animales. Los Respondedores (R), quienes mostraron broncoobstrucción, llegando a triplicar el iB , y tener un aumento estadísticamente significativo en el infiltrado celular, mientras que en los No Respondedores (NR), no se observó ningún cambio. Veinticuatro horas después del último reto se determinó la reactividad de las VA a la histamina y los cobayos fueron sacrificados obteniendo el LBA y suero. En el sobrenadante de ambas muestras se evaluaron los niveles de expresión de los dominios intracelular y extracelular de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). La expresión del dominio extracelular de ambas subunidades correlacionó directamente con la magnitud de la reactividad de las VA en sobrenadante de suero, así como el dominio intracelular de la subunidad $\beta 2$ en sobrenadante del LBA. Este dominio se reporta por primera vez en este estudio como forma soluble. Además, se observó un incremento de la forma soluble del dominio intracelular de la subunidad $\beta 2$ en los animales NR para el modelo agudo con respecto al grupo control en el LBA. A su vez, se determinó la cantidad y tipo de células inflamatorias en LBA mediante la técnica de tinción diferencial de Romanowsky. Los R para el modelo agudo presentaron eosinofilia y el infiltrado de estas células correlacionó directamente con la expresión de la forma soluble del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, sugiriendo que estas células podrían ser la fuente de liberación de este dominio. Nuestros datos sugieren que a pesar de que no se observan diferencias entre los grupos, se encontró una asociación inversa de ambas subunidades de la integrina con HVA, sugiriendo que estas proteínas tienen un papel importante en el desarrollo del asma.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CMH-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
CPA	Células presentadoras de antígeno
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FEV ₁	Flujo espiratorio forzado al primer segundo
HVA	Hiperreactividad de las vías aéreas
íB	Índice de broncoobstrucción
FcεRI	Receptor de alta afinidad para la IgE
IgE	Inmunoglobulina E
i.p	Intraperitoneal
LAD	Deficiencia en adhesión leucocitaria
LBA	Lavado broncoalveolar
MEC	Matriz extracelular
NR	No respondedores
OVA	Ovoalbúmina
PC ₂₀	Dosis provocativa 20
PD ₂₀₀	Dosis provocativa 200
R	Respondedores
RS	Receptor soluble
RTr	Receptor transmembranal
SSF	Solución salina fisiológica
VA	Vías aéreas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías aéreas

Las vías aéreas (VA) constituyen la unión entre las unidades respiratorias pulmonares y el mundo exterior. Están conformadas por una serie de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran más profundamente dentro del pulmón (West, 2002). Estructuralmente las VA se subdividen en dos porciones principales, la superior y la inferior. La porción superior está constituida por la nariz, cavidad oral y faringe. Por otro lado, la porción inferior consta de la laringe, tráquea y el árbol bronquial (Fig. 1a). Funcionalmente existen dos grandes zonas en la VA, la zona de conducción y la zona respiratoria. En la zona de conducción pueden distinguirse vías cartilagosas (tráquea y bronquios) y vías no cartilagosas (bronquiolos y bronquiolos terminales; Fig. 1a). Después de los bronquiolos terminales, comienza la zona respiratoria, donde se produce el intercambio pulmonar de gases (Tresguerres, 1992).

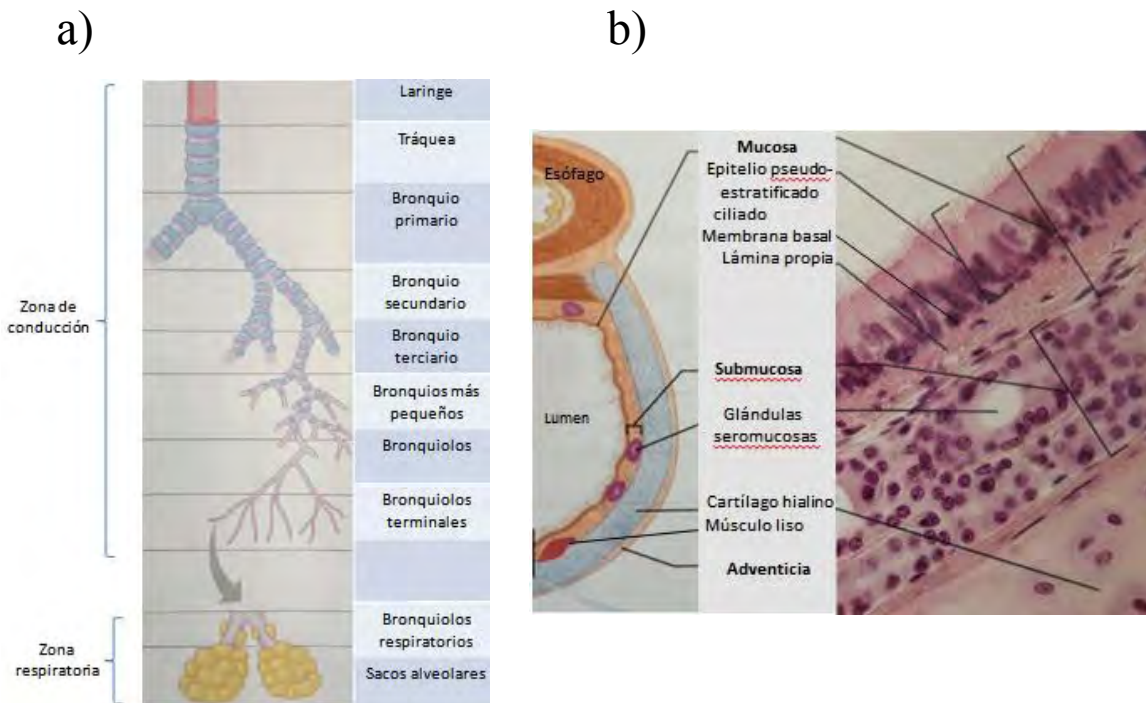


Figura 1. Características anatómicas de las vías aéreas. a) Zona de conducción y zona respiratoria (Modificado de Tresguerres, 1992). b) Sección transversal de tráquea (izquierda), microfotografía de la pared de tráquea 320x (derecha) (Modificado de Elaine et al, 2010)

Histológicamente, las VA constan de tres capas principales: la mucosa, la submucosa y la adventicia (Fig. 1b). En enfermedades obstructivas estas capas muestran alteraciones. El asma es una de las patologías más frecuentes que presenta condiciones obstructivas en las VA (Bergeron C. *et al*, 2006).

1.2 Asma

Asma es derivada de una palabra griega que significa “jadeo” (Sell, 2001). De acuerdo a la definición de la Estrategia global para el manejo y prevención del asma (GINA, por sus siglas en inglés), el asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las VA, en la cual diversas células y elementos celulares desempeñan un papel importante. La inflamación crónica está asociada con la hiperreactividad de las VA que conduce a presentar episodios recurrentes de sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos, particularmente en la noche o por la mañana. Estos episodios se asocian generalmente a una obstrucción excesiva y variable del flujo de aire pulmonar que es a menudo reversible, de forma espontánea o con tratamiento (GINA, 2011).

El asma es el principal problema de salud pública, afectando a 300 millones de personas en todo el mundo (Kim *et al*, 2010). En algunos países, el asma ha alcanzado proporciones alarmantes afectando hasta una tercera parte de los niños en general (Roa *et al*, 2009). De acuerdo al Informe financiero y actuarial del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), en México durante el 2007, el asma ocupó el lugar número 14 dentro de las principales causas de morbilidad (0.7%); (ISSSTE, 2007). Mientras que el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el 2009 reportó que se atienden 250 mil urgencias y 15 mil hospitalizaciones por año (IMSS, 2009). Según la última estadística con la que cuenta el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el asma es la primera causa de atención en consulta externa y urgencias (32.8%), ocupando el segundo lugar en hospitalización (Mendez *et al*, 2003; INER, 2002).

1.3 Fisiopatología del asma

El asma puede ser causada por múltiples factores en combinación con más de 100 genes de susceptibilidad. Entre los factores conocidos se encuentran: humo de cigarro, diesel, obesidad, aspirina y ejercicio, algunos de ellos actuando sinérgicamente en los pacientes, lo que da como resultado diferentes fenotipos de asma (Kim *et al*, 2010). Sin embargo, la forma de asma más común es causada por alérgenos, término que se refiere a un antígeno capaz de estimular respuestas de hipersensibilidad en individuos atópicos, (característica asociada a la producción específica de Inmunoglobulina-E, IgE), en respuesta hacia alérgenos ambientales comunes. Esta es llamada asma alérgica (Pearce *et al*, 1999).

El proceso de sensibilización al alérgeno inicia cuando este es capturado y procesado por células presentadoras de antígeno (CPA), principalmente por células dendríticas, situadas a lo largo de las VA, aunque también cumplen esta función otras células como basófilos, eosinófilos y mastocitos (Kim *et al*, 2010). Una vez dentro de las VA, las CPA, a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (CMH-II), presentan el antígeno a los linfocitos T "naïve" (Th0) (Holgate, 2008; Bousquet *et al*, 2009). La capacidad de las células dendríticas para producir IL-12, determina la diferenciación del linfocito Th0, a linfocito Th1, mientras que la IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, promueve la diferenciación a linfocitos Th2. Estos últimos también interactúan con los linfocitos B e inducen la producción de IgE, la cual se une a los mastocitos y basófilos por su receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI; Fig. 2). En este momento el individuo se ha sensibilizado al alérgeno (Holgate *et al*, 2009, Goldsby *et al*, 2003).

La expresión del asma es un evento posterior que comienza cuando el alérgeno es expuesto por segunda vez, promoviendo el entrecruzamiento entre las moléculas de IgE y FcεRI localizados en las células ya sensibilizadas (Ying *et al*, 2006). Las células activadas, liberan rápidamente mediadores proinflamatorios tales como histamina y eicosanoides (leucotrienos y prostaglandinas), así como especies reactivas de oxígeno y citocinas quimioatrayentes para otras células inflamatorias, los cuales inducen contracción del músculo liso, secreción de moco y vasodilatación. La microcirculación bronquial tiene un papel central en el proceso inflamatorio ya que induce un filtrado con exudación de plasma

hacia las VA (Pearce *et al*, 1999; Bousquet *et al*, 2000). Esta fase se le conoce como reacción de fase aguda comenzando entre los 15-30 minutos después de la segunda exposición al alérgeno. En algunos casos, esta fase puede traer como consecuencia la fase de reacción tardía, la cual ocurre de 6-9 horas posteriores a la exposición del alérgeno y envuelve el reclutamiento y activación de células inflamatorias como eosinófilos, células T, neutrófilos, basófilos, y macrófagos (Bousquet *et al*, 2000).

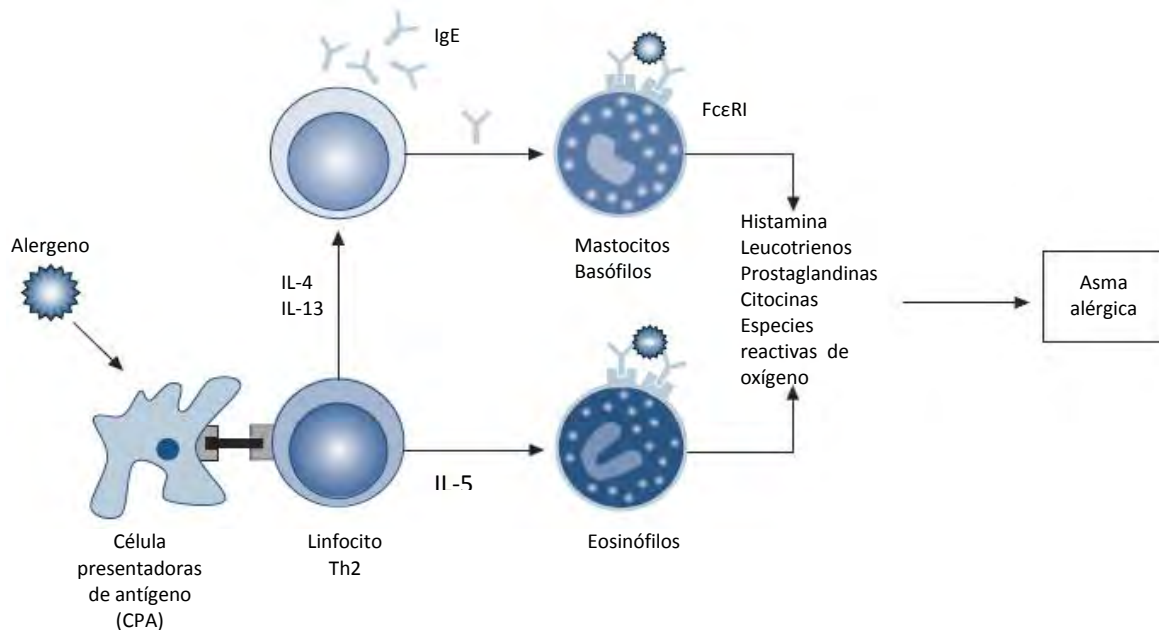


Figura 2. Respuesta inflamatoria en las vías aéreas durante el asma (Modificado de Holgate, 2008).

Aunque la mayoría de los casos de asma están asociados con atopia, hay formas que parecen ser independientes de esta característica. La forma no alérgica de la enfermedad, llamada asma intrínseca, ha sido sujeta a investigación, y aunque las vías patogénicas aún no han sido identificadas, la inmunopatología entre ambas parece ser muy similar (Holgate *et al*, 2009). El asma intrínseca no se asocia con la exposición a alérgenos específicos ni está mediada por mecanismos inmunitarios, además de que puede presentarse en cualquier época del año, ejemplo de esta, es el asma inducida por obesidad, aspirina, ejercicio y humo de cigarro. Por el contrario el asma extrínseca o atópica, además de presentar mecanismos inmunitarios (mecanismos de hipersensibilidad de tipo-I o dependientes de IgE) se asocia con una fuerte carga genética y con ciertas épocas del año (Rabinovich, 2004; Sell, 2001).

A pesar de las diferencias en los fenotipos conocidos en asma, ambas formas se caracterizan por inflamación, obstrucción reversible del flujo de aire, e hiperreactividad de

las VA, siendo esta última la alteración fisiopatológica más importante, ya que correlaciona con la gravedad de la enfermedad, al punto que la definición actual de esta entidad incluye a la hiperractividad de las VA como condición inherente al diagnóstico (O'Byrne, 2003).

1.4 Hiperreactividad de las vías aéreas (HVA)

La reactividad de las VA, es un término que describe la capacidad natural de las VA a estrecharse después de la exposición ante agonistas constrictores (Woolcock A., *et al*, 1984; O'Byrne, *et al*, 2003). En consecuencia, la HVA es un incremento en esta habilidad al estrecharse más rápido y fácilmente en respuesta a varios estímulos, necesitando una menor concentración de un constrictor para así iniciar una respuesta broncoobstructiva, que normalmente en la mayoría de la población no se originaría, o ésta es de poca magnitud. La HVA es la característica universal del asma y por lo tanto ha sido incluida en las propiedades que la definen, sin embargo, no es exclusiva de esta enfermedad (Boulet, 2003).

Los métodos para medir la reactividad de las VA han sido estandarizados y ampliamente aceptados (O'Byrne, *et al*, 2003). Usando el método descrito por Cockcroft *et al*, en 1997, los sujetos asmáticos generalmente tienen una concentración provocativa ($<8\text{mg/mL}$) de una sustancia (histamina o metacolina) la cual causa un 20% en la caída del flujo espiratorio máximo al primer segundo (FEV_1), llamada PC_{20} (Fig. 3). En base a esto, la HVA puede ser cuantificada al medir FEV_1 antes y después de la administración de un alergeno, utilizando dosis crecientes de agentes constrictores. Por lo que el grado de reactividad de la VA, mostrará una correlación negativa con FEV_1 (Cockcroft *et al*, 1997; O'Byrne, *et al*, 2003).

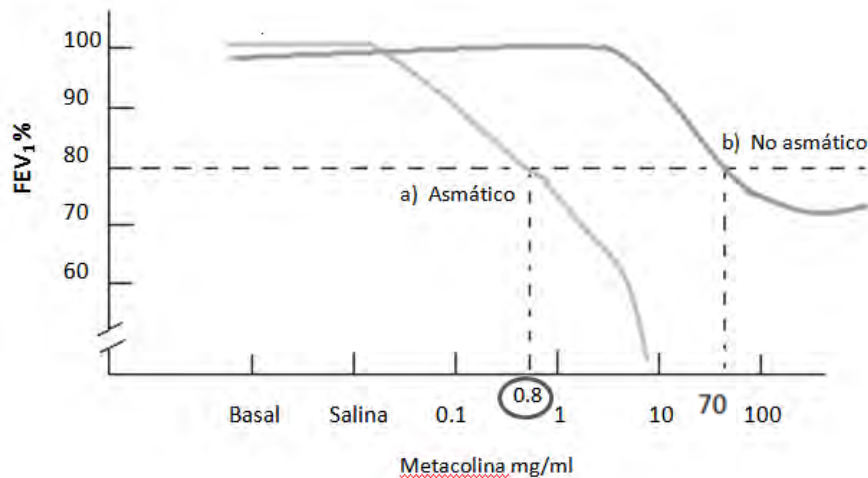


Figura 3. Curva dosis-respuesta ante concentraciones crecientes de metacolina, indicando la caída del volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV₁). (a) Pacientes con asma muestran un reducido umbral de respuesta a pequeñas dosis (0.8mg/ml), (b) individuos sanos muestran reactividad de las VA ante dosis mayores. (Modificado de Salas *et al*, 2005).

1.5 Broncoobstrucción

La broncoobstrucción es un término que se refiere al estrechamiento de las vías respiratorias a causa de la contracción de los músculos que rodean los bronquios (Douglas M. *et al*, 1999). La broncoobstrucción limita el flujo, incrementando la resistencia en la conducción de aire en las VA y puede ser resultado de la presencia de edema, la acumulación de moco, la remodelación de las VA, la contracción del músculo liso y la inflamación de las VA (Hogg, 2004).

1.6 Inflamación de las vías aéreas

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las VA. Inflamación significa “incendio” y es el proceso primario a través del cual, el cuerpo repara el daño tisular y se defiende contra infecciones y agentes externos (Goldsby *et al*, 2003).

La adhesión leucocito-célula endotelial o leucocito-sustrato contribuyen al proceso de inflamación en las VA y consecuentemente a la HVA. La acumulación de eosinófilos y neutrófilos dentro de las VA, requiere de la migración de estas células a través del endotelio venular microvascular, tejido extravascular, y si es necesario, el epitelio de las VA, hasta llegar al sitio dañado, comenzando con el proceso de inflamación, para llevar a cabo la

reparación del tejido (Fig. 4). Este infiltrado de leucocitos es retenido en su destino para regular y mediar respuestas inmunes e inflamatorias. El funcionamiento coordinado de los receptores de adhesión en leucocitos, endotelio, matriz extracelular (MEC) y epitelio, así como el citoesqueleto y las moléculas de señalización es crucial para la migración y extravasación de los leucocitos (Leff *et al*, 1991; Barreiro *et al*, 2009).

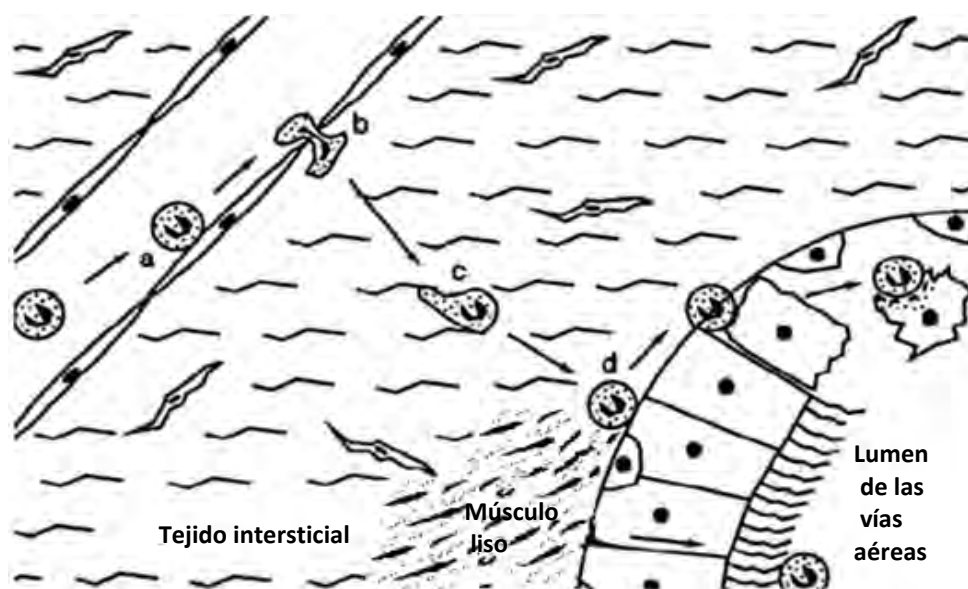


Figura 4. Migración de leucocitos en las vías aéreas. a) contacto con el endotelio venular microvascular, b) extravasación c) migración a través del tejido intersticial d) contacto con el epitelio de la VA (Modificado de Leff *et al*, 1991).

La inflamación, la HVA y la broncoobstrucción se han estudiado en nuestro grupo de investigación mediante un modelo de asma alérgica en cobayo.

1.7 Modelos de asma

Existen varios modelos de asma en el cobayo y el que utilizamos en el laboratorio y en el presente trabajo, es un modelo de asma alérgica donde la función respiratoria de los cobayos se evalúa mediante pletismografía barométrica. Esta técnica mide los cambios de presión durante la inhalación y la exhalación del cobayo al ser colocado dentro de una cámara de pletismografía.

Nuestro modelo de asma consiste en sensibilizar cobayos a la ovoalbúmina (OVA) para posteriormente administrarles retos antigénicos cada diez días. Se ha visto que los cobayos sensibilizados pueden desarrollar el modelo de asma, esto es, presentan broncoobstrucción,

AHR e inflamación de las VA después del reto; pero alrededor de un 28% de los cobayos solo presentan AHR después del reto, esto es, no tienen broncoobstrucción ni inflamación de las VA inducida por el reto. A los cobayos que desarrollan el modelo de asma les denominamos R y los que solo presentan HVA les denominamos NR. El desarrollo de hiperreactividad sin síntomas de asma se conoce como hiperreactividad asintomática en los humanos y es un factor importante de predisposición a enfermedades respiratorias (Boulet, 2008). Aunque se desconocen los mecanismos asociados a la hiperreactividad asintomática, es probable que algún mecanismo de tolerancia inmunológica este asociado. En nuestros cobayos hemos visto que el perfil de linfocitos de los cobayos R o modelo de asma es predominantemente Th2 y Th17, mientras que los cobayos NR tiene un perfil de linfocitos predominantemente Tregs, lo que sugiere que éstos últimos si están desarrollando algún tipo de tolerancia inmunológica (Ramos-Ramírez, 2011).

1.8 Integrinas

Las integrinas son una superfamilia de receptores de adhesión celular, que reconocen ligandos de matriz extracelular (MEC) y de superficie celular (Hynes R., 2002). Su nombre se debe a que mantiene la integridad entre los ambientes extracelular e intracelular por la unión de ligandos que se encuentran fuera de la célula con componentes del citoesqueleto y moléculas de señalización (Anderson *et al*, 1987). Las integrinas están ampliamente expresadas en todas las células excepto en los eritrocitos maduros. Participan en procesos como adhesión, proliferación, supervivencia o apoptosis, forma, polaridad, motilidad, haptotaxis, expresión de genes y diferenciación. Son necesarias para el desarrollo de células hematopoyéticas y vasculares, tráfico de leucocitos (inflamación), angiogénesis y migración celular en respuesta a algún daño a través del reconocimiento de la MEC (Leff, *et al*, 1991; De Melker *et al*, 1999; Hynes, 2002; Takada *et al*, 2007; Barczyk *et al*, 2010).

Las integrinas son heterodímeros formados por una asociación no covalente entre las subunidades α y β . En vertebrados, esta familia está compuesta de 18 subunidades α y 8 subunidades β , las cuales pueden ensamblarse en 24 heterodímeros diferentes, cada una con especificidad y propiedades de señalización diferentes (Hynes, 2002; Giancotti *et al*, 1999; Fig. 5a).

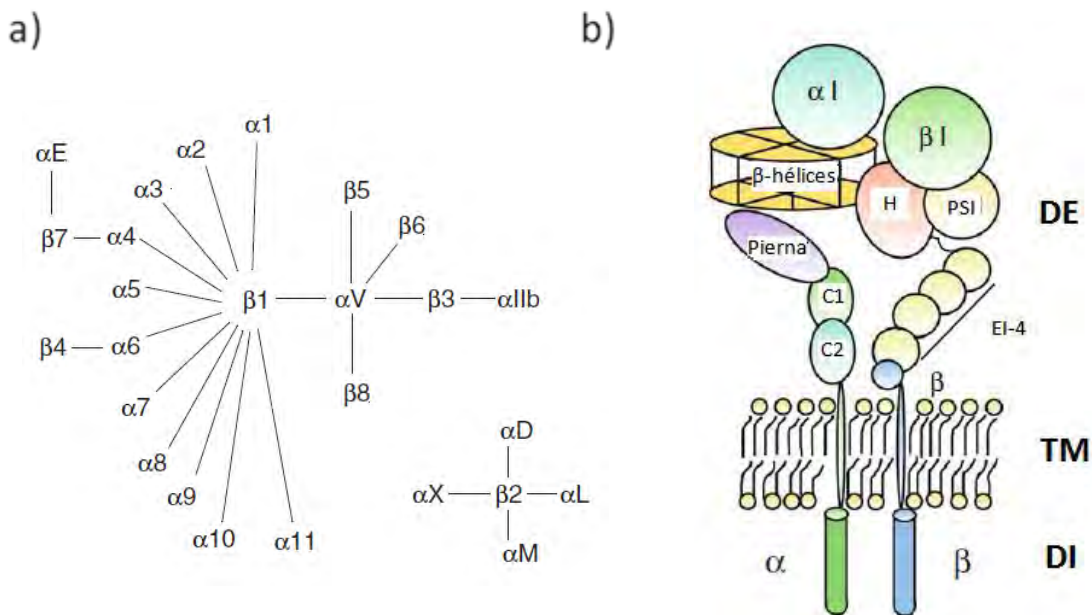


Figura 5. Superfamilia y estructura de integrinas. a) Superfamilia de las integrinas humanas y cómo ellas se combinan para formar integrinas heterodiméricas (Tomado de Takada Y. *et al*, 2007). b) Estructura de la integrina $\alpha 1$ y $\beta 1$. DE=dominio extracelular, TM=dominio transmembranal, DI=dominio intracelular (Modificado de Barczyk M., *et al*, 2010).

Ambas subunidades conforman una proteína transmembranal tipo I, con un gran dominio extracelular de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos para la subunidad α y alrededor de 700 residuos para la subunidad β , un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico pequeño de 30-50 residuos de aminoácidos (Fig. 5b), carente de función enzimática, por lo que las integrinas llevan a cabo la traducción de señales a través de proteínas adaptadoras que conectan al medio extracelular con el citoesqueleto, cinasas citoplásmicas y receptores de factores de crecimiento transmembranales (Shakibaei *et al*, 1995, Giancotti *et al*, 1999, Humpries, 2000;). La expresión de integrinas puede ser utilizada como una detección temprana y un mecanismo de respuesta a cambios en el nivel y composición en la MEC, como podría ocurrir durante la respuesta inflamatoria (Sheppard *et al*, 2003).

1.9 Subunidad $\beta 1$ de integrina

La subunidad $\beta 1$ de integrina, también llamada VLA1 (Very Late Activation), pertenece a la familia más grande de las integrinas. Está compuesta por la subunidad $\beta 1$ y una de las 12 subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 11$ y αV ; Fig. 5a). Su principal función es la adhesión con diversos componentes de la MEC, aunque también participa en proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Kagami *et al*, 2004). En humanos, la expresión de la subunidad $\beta 1$ está codificada por un único gen, ITGB1 localizado en el cromosoma 10p11.2 (Takada *et al*, 2007). Cuatro variantes del dominio citosólico generadas por empalme alternativo han sido identificadas, $\beta 1A$, $\beta 1B$, $\beta 1C$ y $\beta 1D$, siendo $\beta 1A$ la variante más abundante en la mayoría de las células (Belkin *et al*, 1998).

La expresión de cada subunidad $\beta 1$ varía de acuerdo al linaje celular y es regulada por el estado de activación de la célula, por citocinas y por hormonas. En las VA de humano, se han encontrado en células epiteliales ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ y $\alpha V\beta 1$), en células mesenquimales *in situ* ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$), en músculo liso ($\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$) y en células progenitoras de músculo liso ($\alpha 1\beta 1$). Los leucocitos por su parte, contienen algunas integrinas de la familia $\beta 1$ incluyendo $\alpha 4\beta 1$ (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, mastocitos), $\alpha 5\beta 1$ (neutrófilos, basófilos, linfocitos), $\alpha 6\beta 1$ (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos) y $\alpha 9\beta 1$ (neutrófilos) (Fernandes DJ *et al*, 2006).

En el 2009, Bazán-Perkins y col., observaron la sobreexpresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina en bronquios y bronquiolos de cobayos que desarrollan el modelo de asma en comparación con los controles. Por medio de inmunohistoquímica, esta subunidad fue identificada sobre en músculo liso, fibroblastos, células epiteliales y leucocitos; sin embargo, también se encontró en áreas donde no había células (membrana basal y lámina propia), y su expresión en estas áreas se asoció directamente con el grado de infiltrado celular y de HVA. En un estudio posterior se pudo identificar, mediante western blot, la expresión de varias variantes la subunidad $\beta 1$ de integrina dentro y fuera (unido a la matriz extracelular) de los miocitos de la tráquea. Estas variantes contenían solo el dominio extracelular o el intracelular o ambos. Estas variantes parecen tener un importante papel en la fisiopatología del asma pues existe una correlación directa entre la expresión de las variantes que solo contienen el dominio intracelular en el músculo liso con el grado de HVA (Álvarez-Santos *et al*, artículo enviado).

1.10 Subunidad $\beta 2$ de integrina

Las integrinas predominantes en la superficie de leucocitos son miembros de la familia $\beta 2$ de integrina conformada por $\alpha L\beta 2$ (lymphocyte function-associated antigen-1); $\alpha M\beta 2$ (Mac-1); $\alpha X\beta 2$ (gp150/95) y $\alpha D\beta 2$. Estas cuatro integrinas se unen a moléculas de adhesión en células endoteliales activadas, pero son inactivas en el resto de los leucocitos que no son estimulados por citocinas (Fernandes *et al*, 2006). En humanos, la expresión de la subunidad $\beta 2$ está codificada por un único gen ITGB2, localizado en el cromosoma 21p22.3 (Takada *et al*, 2007). A través de las variantes de la secuencia LDV, la subunidad $\beta 2$ de integrina, reconoce moléculas de adhesión como ICAM (Barczyk, 2010.)

La importancia de estas integrinas en la extravasación de los leucocitos está demostrada en humanos por una deficiencia en la adhesión de los leucocitos (LAD), provocada por la síntesis anormal de las cadenas β , debido a ello los leucocitos no pueden extravasar desde los vasos sanguíneos a los tejidos durante el proceso infeccioso provocando infecciones bacterianas recurrentes (Rabinovich, 2004). Ratones "knockout" de la subunidad $\beta 2$ de integrina, presentan la mayoría de las características de LAD, incluyendo leucocitosis, infecciones espontáneas y migración alterada de neutrófilos hacia la piel infectada o inflamada, sumado a esto, se observó defectos en la proliferación de linfocitos T, confirmando la importancia de señales coestimuladoras para las integrinas $\beta 2$ (Sheppard, 2000). En condiciones inflamatorias, se han identificado niveles incrementados de la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina, lo que sugiere una posible función en la activación y en el tráfico de leucocitos. Las formas solubles recombinantes de las integrinas que poseen la subunidad $\beta 2$ han demostrado ser funcionales por anticuerpos contra epítopos funcionales, mostrando que ni la región citosólica ni la región transmembranal son necesarias para formar heterodímeros (Gomez *et al*, 2011). Estudios previos han también demostrado que durante la inflamación en la superficie de los leucocitos existe una pérdida de la integrina $\beta 2$. Esta pérdida se ha identificado en neutrófilos infiltrados en reperusión miocárdica canina y los heterodímeros solubles se presentan en la linfa (Youker *et al*, 2000), en humanos se han observado ectodominios de $\alpha L\beta 2$ en líquido de vejiga (Evans *et al*, 2006). Además el corte proteolítico de la integrina $\beta 2$ con diferentes subunidades α han mostrado ser parte de la inflamación sinovial en artritis reumatoide y espondiloartritis (Gjelstrup *et al*, 2010). Estos autores además demostraron la habilidad de la integrina

soluble para inhibir la adhesión de monocitos a ICAM-1. Por lo tanto, la forma soluble de la integrina $\beta 2$ tiene la habilidad para regular la adhesión de los leucocitos, este receptor soluble ha sido identificado en fluidos biológicos de múltiples estados inflamatorios *in vivo*, pero la significancia funcional no ha sido investigado (Gómez *et al*, 2011).

1.11 Receptores solubles

Los receptores son estructuras macromoleculares de naturaleza proteica. Tienen dos funciones esenciales: reconocer al ligando y propagar el mensaje hacia el interior de la célula. Esto se hace por dos dominios diferentes, un dominio de unión al ligando y un dominio efector.

La noción clásica, es que los receptores son proteínas transmembranales, citoplásmicos o nucleares, sin embargo, muchos receptores poseen formas solubles que son liberados al espacio extracelular. Asimismo, los ligandos no siempre son proteínas que están flotando libremente, sino que podrían ser encontrados en la superficie celular. Los receptores solubles (RS) afectan el balance entre los ligandos y sus receptores transmembranales (RTr), y por lo tanto la expresión alterada de estos receptores se ha asociado con enfermedades humanas (Arribas *et al*, 2002). El uso terapéutico de estos receptores proveerá una herramienta adicional para modificar y optimizar respuestas biológicas en estados de enfermedad.

Los RS generalmente comprenden las porciones extracelulares de los RTr y por lo tanto mantienen la capacidad de unirse al ligando. Los RS se pueden formar mediante empalme alternativo, dando lugar a la formación de polipéptidos que pierden su dominio transmembranal, y posteriormente estos polipéptidos son secretados al medio extracelular. También se ha observado que por corte proteolítico de los dominios extracelular e intracelular, se pueden generar receptores solubles (Arribas J. *et al*, 2002). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes. En la figura 7 se muestran algunos efectos biológicos a través de mecanismos de acción ejercidos por este tipo de receptores (Heaney *et al*, 1998).

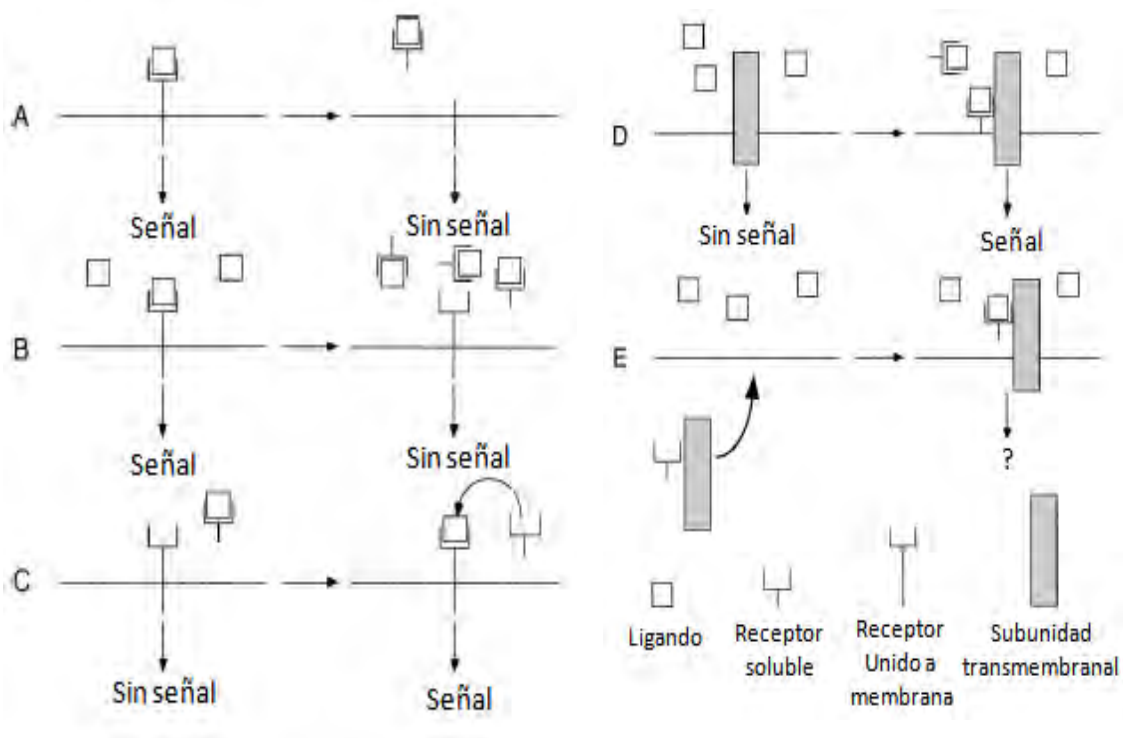


Figura 7. Mecanismos de acción de los Receptores solubles (RS). A) Corte proteolítico que resulta en una regulación negativa del RTr. B) El RS actúa como un inhibidor competitivo ante el RTr. C) RS protege al ligando que está en el suero de ser degradado. D) Asociación del RS con subunidades transmembranales y activar la traducción de señales. E) RS se asocian con subunidades no unidas, sólo cuando ambas son expresadas endógenamente (Modificado de Heaney *et al* 1998).

2. Planteamiento del problema

En la actualidad no se disponen de marcadores no invasivos que indiquen la magnitud de la severidad del asma. Es probable que en el asma se expresen receptores como las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ de forma soluble, y esto podría ser utilizado como una herramienta terapéutica para detectar respuestas biológicas en el asma. Adicionalmente, el modelo de asma alérgica que utilizamos en el laboratorio nos podría permitir la evaluación de la expresión de variantes solubles de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en dos tipos de procesos patológicos de las VA que se caracterizan por desarrollar HVA en presencia (cobayos R) o en ausencia (cobayos NR) de inflamación de las VA.

3. Hipótesis

La expresión de integrinas solubles en el sobrenadante de lavado broncoalveolar y suero, tienen una correlación positiva con el grado de inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica.

4. Objetivos

General

- Relacionar la expresión de la forma soluble del dominio extracelular e intracelular de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina con la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo.

Particulares

- Evaluar la magnitud de la reactividad y la inflamación de las vías aéreas, en cobayos retados de manera repetitiva con ovoalbúmina.
- Determinar la expresión del dominio extracelular e intracelular de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina en LBA y suero.

- Correlacionar la expresión de los dominios antes mencionados con la infiltración de células inflamatorias en LBA y con el grado de hiperreactividad de las vías aéreas.

5. Material y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron 30 cobayos (*Cavia porcellus*) machos sanos de la cepa HsdPoc:DH, con pesos aproximados de 350 a 450g al inicio del protocolo, mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), bajo condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación: 12/12 de ciclo de 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 B25-11).

5.2 Sensibilización antigénica

5.2.1 Día 1

Los cobayos fueron sensibilizados con una mezcla de ovoalbúmina (OVA: 0.06 mg/ml, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) como adyuvante (1 mg/ml; J.T. Baker. NL. EU), disueltos en 30 ml de solución salina fisiológica (SSF; modificado de Campos *et al*, 2001). Esta mezcla se dividió en dos dosis de 0.5 ml, las cuales se administraron por vía subdérmica e intraperitoneal (i.p). Para el grupo control (n=6), se administró el mismo volumen pero utilizando solamente SSF.

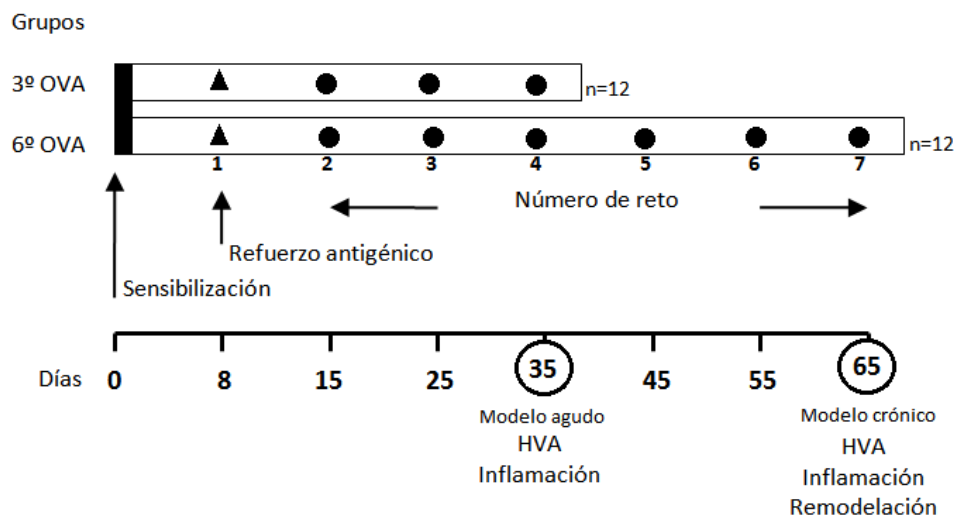


Figura 8. Esquema que muestra el proceso de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica. HVA=hiperreactividad de las vías aéreas.

5.3 Pletismografía barométrica

5.3.1 Día 8

El refuerzo antigénico se realizó ocho días después, colocando a los animales en cámaras aisladas, estas fueron provistas de flujo de aire continuo (10 ml/s), el cual no modifica la señal respiratoria durante el experimento. En estas cámaras se registró el índice de bronco-obstrucción (ÍB) basal, mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, EU). Posteriormente se suministró OVA en forma de aerosol (3 mg/ml SSF) durante 5 minutos con un nebulizador (US-Bennett, flujo de 2 ml/min). Este nebulizador libera 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 . Una hora después se registró la respuesta de bronco-obstrucción 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 (Bazán Perkins *et al*, 2004). Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EU) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por un programa (Buxco Biosistem XA v1.1) instalado en una computadora. Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 mL o más, con un tiempo mínimo espiratorio de 15 s, tiempo inspirado de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspirados y expirados 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 periodo 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 minutos de cada periodo. Esto se realizó con el fin de evitar la influencia de eventos externos al estudio y mantener la posibilidad de detectar los cambios agudos.

El pletismógrafo barométrico cuantifica entre otras cosas el íB que refleja el grado de obstrucción de las VA (Hamelmann *et al*, 1997; Chávez *et al*, 1996). Los fundamentos del

íB se basan en los cambios de volumen del aire ambiental y el que está dentro de los pulmones del cobayo, debido a que durante la inspiración el aire ambiental, al entrar en los pulmones, se calienta de 25° a 37°C y 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 animal 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 (Drorbaugh, 1995). De esta manera aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa computacional puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y la espiración en el tiempo previamente calibrado (Hamelmann *et al*, 1997, Fig. 9). La información es procesada mediante el programa antes mencionado, para calcular el valor del íB que es obtenido por la siguiente fórmula:

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

Dónde:

íB = Índice de broncoobstrucción

T_e = Tiempo total espiratorio (s)

T_r = Tiempo total de relajación (s)

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

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

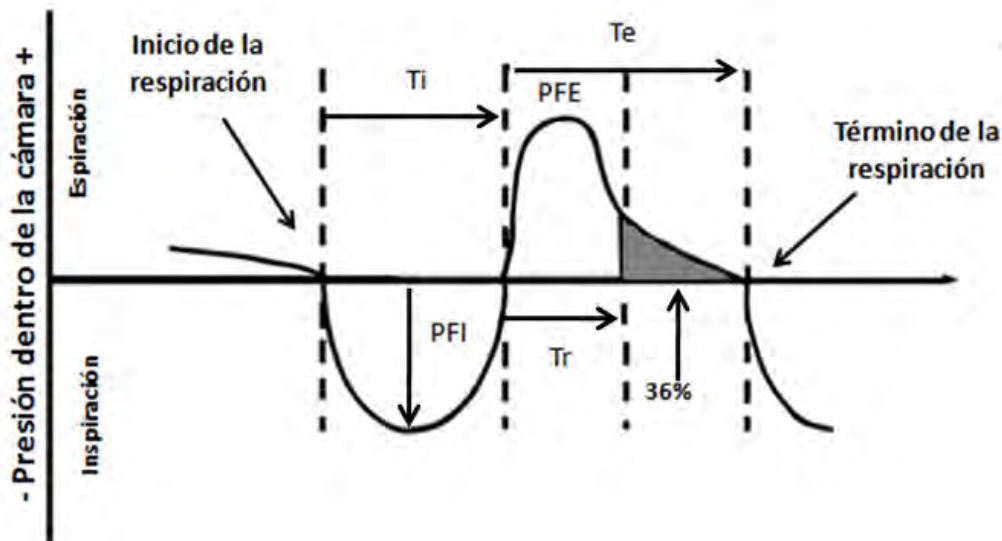


Figura 9. Parámetros obtenidos por pletismografía barométrica. Esquema de una onda durante el ciclo respiratorio, inspiración (onda hacia abajo) y espiración (onda hacia arriba) en una cámara de presión de libre movimiento. T_i = tiempo de inspiración (s), tiempo desde el comienzo de la inspiración hasta el final de la misma; T_e = tiempo de espiración (s), tiempo desde el final de inspiración hasta el comienzo de la siguiente inspiración; PFI= pico de flujo inspiratorio (ml/s) máxima presión negativa que ocurre durante una inspiración; PFE = pico de flujo espiratorio (ml/s), máxima presión positiva de la cámara que ocurre en una espiración; T_r = tiempo de relajación (s), tiempo en que la presión decae un 36% del total de la presión dentro de la cámara durante la espiración (Tomado de Hamelmann *et al*, 1997).

5.4 Retos Antigénicos

Durante el primer reto antigénico (ocho días posteriores al refuerzo), a los cobayos se les administró OVA (1 mg/ml SSF) durante 1 minuto, colocándolos en el pletismógrafo barométrico (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, EU), siguiendo el protocolo utilizado para el refuerzo antigénico (día 8), registrando el iB basal y la respuesta bronco-obstructiva máxima. Al grupo control se le administró únicamente SSF para todos los retos.

Los retos subsecuentes se administraron con un intervalo de diez días. Se siguió un protocolo similar al del día 15 pero la dosis de OVA administrada fue de 0.5 mg/ml SSF, durante 1 minuto, registrando el iB durante 1h. Llegando al tercer reto (día 35) para el modelo agudo, y sexto reto (día 65) para el modelo crónico (Fig. 8).

5.5 Reactividad de las vías aéreas

La reactividad de las VA se evaluó en los grupos controles y experimentales en el tercer y sexto reto con OVA (día 35 y 65 respectivamente), comparando las curvas dosis-respuesta a la histamina antes y después de la administración de OVA. Para esto, inicialmente se registró el íB basal durante cinco minutos y se obtuvo el valor promedio. Se administraron durante un minuto dosis no acumulativas de aerosoles de histamina (0.013 - 0.32 mg/ml; Sigma Aldrich Company, St Louis, EU), con un intervalo de 10 minutos entre cada dosis. Cuando alguna dosis de histamina triplicó el valor de íB basal (dosis provocativa 200 ó PD₂₀₀) se terminó la curva y se esperó a el íB regresa al 50% del valor basal (Bazán-Perkins *et al*, 2004). Posteriormente, se retó con aerosoles de OVA (0.05 mg/ml SSF) durante un minuto. La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA, siguiendo el mismo protocolo que la primera curva (Sommer *et al*, 2001). Un grupo adicional de cobayos que se tomó como el control de la reactividad de las VA a la histamina solo recibió nebulizaciones de SSF.

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

Veinticuatro horas después de realizada la segunda curva a histamina, los animales fueron sobredosificados con una inyección vía i.p. de pentobarbital sódico (28 mg/kg) hasta producir paro cardiorrespiratorio. Posteriormente, se realizó una traqueotomía para introducir una cánula endotraqueal por donde se administró dos veces 5 ml SSF estéril a 37°C, con ayuda de una jeringa. En cada vez, el fluido se recuperó 1 min después y el total se centrifugó (5 minutos, 1500 rpm, 4°C; Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania) para obtener el sedimento celular que se resuspendió en 1 ml de SSF. El sobrenadante se guardó a 4°C, para posteriormente evaluar la expresión de proteínas mediante la técnica de ELISA. Para determinar el número total de células en el LBA, se tomaron 10µl del sedimento celular y se les agregó 40 µl de azul de tripan al 0.4 % (Sigma Aldrich Company, St Louis, EU). Se colocó 10 µl de esta mezcla en una cámara de Neubauer, donde se realizó el conteo directo de las células en 25 cuadros. Este valor se multiplicó por el factor de dilución (5), y por el factor de la cámara (10,000) reportando así el número de células por mililitro de LBA. El volumen celular se ajustó a 1×10^6 cel/ml adicionando SSF, y 50 µl de esta

mezcla. Se colocó en una citrocentrífuga 7120 (Aerospray Wescor Cytospin, Utah, EU) durante 5 minutos a 850 rpm para obtener un botón celular, el cual fue teñido con la técnica de Romanowsky para realizar el conteo diferencial. Esta tinción se realizó con una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology Reagent ABC, WA, EU) como colorantes principales. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz (Karl Zeiss, Oberkochen, Alemania) a un aumento de 100x.

5.7 Obtención de suero

Posterior a la obtención del LBA, se introdujo un Sistema de Extracción de Sangre (S-Monovette, Sarstedt, Alemania) en el ventrículo derecho del cobayo. La cantidad obtenida de sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante se guardó a 4°C para ser utilizado posteriormente en la técnica de ELISA.

5.8 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La detección de la forma soluble de los dominios de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina se desarrolló mediante una ELISA directa. Para definir las condiciones óptimas se realizaron diluciones decrecientes del anticuerpo para cada subunidad así como de los distintos anticuerpos secundarios. Se sensibilizó la placa de microtitulación (Costar, Cambridge, EU) con 50 μ l de sobrenadante de LBA ó 50 μ l de sobrenadante de suero, este último diluido 1:20 en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 y 50 μ l de PBS y albúmina bovina al 0.05 % como control. La placa se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron 6 lavados por 3 minutos en agitación a 200 rpm (Rotor Hoefler, New Orleans, EU), agregando en cada pozo 200 μ l de PBS 1x (NaH_2PO_4 13 mM, Na_2HPO_4 88 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) y Tween20 (Sigma Aldrich Company, St Louis, EU) al 0.05 %. Posteriormente, se bloquearon las placas añadiendo a cada pozo 100 μ l de la siguiente solución: PBS-Tween20 al 0.05 % y albúmina bovina al 3 %, por 3h a 37°C. Se lavaron las placas y se colocó en cada pozo 50 μ l de cada uno de los siguientes anticuerpos tanto en LBA como en suero: subunidad $\beta 1$ de integrina dominio citosólico: anticuerpo policlonal anti- $\beta 1$ de humano

(Millipore, Billerica, EU); dominio extracelular: anticuerpo monoclonal anti- β 1 de ratón (R&D systems, Minneapolis, EU). Para la subunidad β 2 de integrina dominio citosólico: anticuerpo policlonal anti- β 2 de humano hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, EU); dominio extracelular: anticuerpo monoclonal anti- β 2 de humano hecho en ratón (R&D, Alemania). Cada anticuerpo fue diluido en PBS 1x-Tween20 y fracción V de albúmina bovina (Sigma, Aldrich Company, St Louis, EU) al 0.05 %. Cada uno se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se lavó y se agregaron 50 μ l de anticuerpo secundario: para la subunidad β 1 de integrina dominio citosólico: anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo (Cappel, Malvern, EU); dominio extracelular: anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-IgG de rata, (Sigma, Aldrich Company, St Louis, EU) para la subunidad β 2 de integrina dominio citosólico: estreptavidina; dominio extracelular: anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (Cappel, Malvern EU). Las placas se incubaron por 2h a 37°C. Se lavaron y se revelaron con 50 μ l de la siguiente solución; para el caso de los anticuerpos peroxidados: 2.5 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1M pH 5, 1 mg de orto-fenildiamina (Sigma, Aldrich Company, St Louis, EU) y 2.5 μ l de H₂O₂ al 3 %. Las placas fueron colocadas en la oscuridad variando el tiempo para cada anticuerpo sin sobrepasar 20 minutos. La reacción se paró con 30 μ l de H₂SO₄ 2.5N. Para el caso del anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, se utilizó la siguiente solución ajustada a un pH 9.8: una pastilla de sustrato para fosfatasa alcalina (Sigma, Aldrich Company, St Louis, EU), 0.097 μ l/mL de dietanolamina (Sigma, Aldrich Company, St Louis, EU) y 0.01 μ g/mL de cloruro de magnesio (MgCl₂), y se paró la reacción con NaOH 3N. La lectura se llevó a cabo a 492 nm para el caso de la estreptavidina y de anticuerpos peroxidados y a 405 nm para la fosfatasa alcalina, en Lector de placas (Labsystems, Buenos Aires, Argentina). Para incrementar la especificidad de los ensayos, cada uno se realizó por triplicado.

5.9 Análisis estadístico

La reactividad de la vía aérea a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200 % (PD₂₀₀), esto es, la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el íB basal. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad Shapiro- Wilk. Se utilizó la prueba pareada de "t" de Student en cada grupo con respecto a uno. Para comparaciones múltiples

se utilizó Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunns, con ayuda del programa estadístico *Graph Pad Prism 5*. La significancia estadística se estableció con una $P < 0.05$. Las barras en las gráficas representan el promedio \pm error estándar. En la asociación de las subunidades de integrina con la inflamación y grado de hiperreactividad, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

6. RESULTADOS

6.1. Tipo de respuesta

En el modelo agudo se utilizaron doce cobayos. Seis mostraron broncoobstrucción inmediata y transitoria ante el reto con OVA. A este grupo se les llamó Respondedores (R), y en menos de una hora, su índice de broncoobstrucción basal se normalizó. Los cobayos restantes que no manifestaron respuesta ante el reto con OVA se les llamó No Respondedores (NR). El mismo número de cobayos fue utilizado para el modelo crónico e igualmente se obtuvieron ambos grupos. La figura 10 representa la respuesta observada para cada uno de estos grupos.

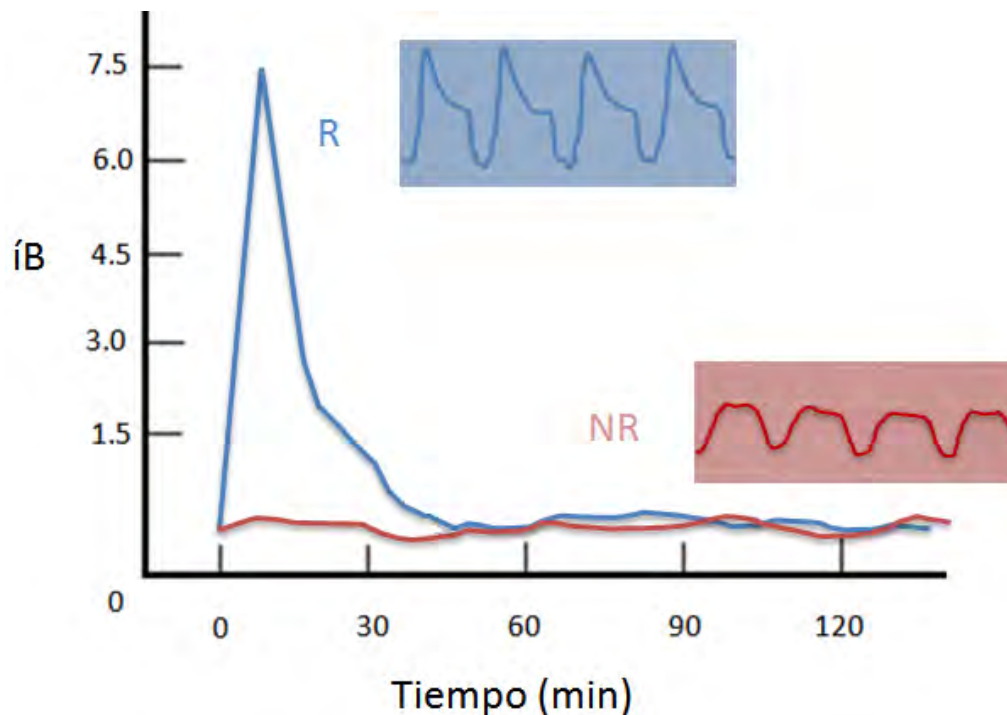


Figura 10. Respuesta de cobayos sensibilizados a la ovoalbúmina (OVA). La gráfica muestra el índice de broncoobstrucción basal (íB) después del reto con OVA en cobayos sensibilizados a través del tiempo. La línea azul muestra una respuesta inmediata y transitoria de los cobayos respondedores, el punto más alto corresponde a la respuesta máxima dada entre los 5-15 minutos después de administrar el reto con OVA. La línea roja indica la respuesta de los cobayos que no manifiestan una respuesta broncoobstructiva ante el reto. A su vez se muestra la representación esquemática del tipo de respuesta registrada en el equipo de pletismografía barométrica. (R) respondedores, (NR) no respondedores.

6.2 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 $\dot{I}B$, no fue diferente de la PD_{200} obtenida después del reto antigénico. La relación PD_{200} post-reto/ PD_{200} basal que representa el grado de reactividad de las VA, fue cercana a 1 en el grupo control y en el grupo de los NR crónicos. Los cobayos R, tanto en el modelo agudo y en el crónico, así como los NR agudos mostraron una PD_{200} post-reto con OVA menor que la PD_{200} basal, por lo que el grado de reactividad aumento (hiperreactividad), mostrando significancia estadística sólo en el grupo de los respondedores agudos y crónicos (Fig. 11).

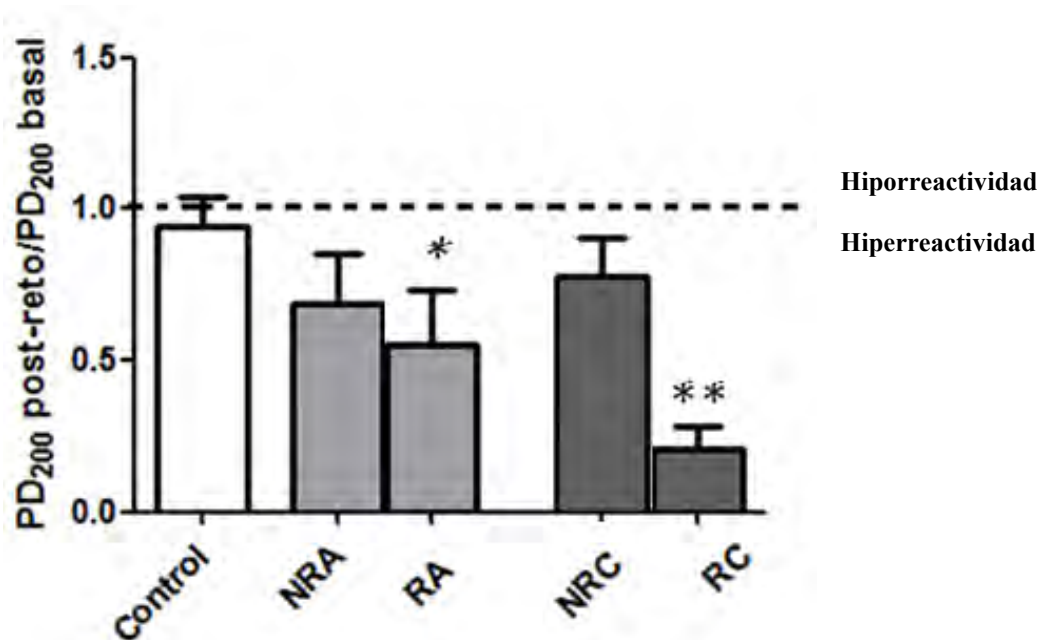
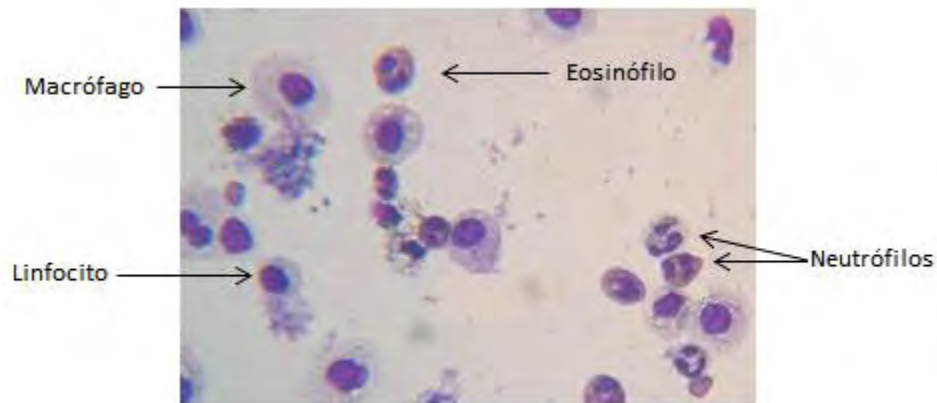


Figura 11. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica aguda y crónica en el cobayo. La gráfica muestra la relación entre la dosis requerida para producir incremento en un 200% al $\dot{I}B$ (PD_{200}) posterior al reto y el PD_{200} anterior al mismo. La línea discontinua muestra el límite entre la hiporreactividad e hiperreactividad. NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$. Prueba pareada de t de Student comparando cada grupo con respecto a 1. Las barras representan el promedio \pm error estándar.

6.3. Conteo celular total y diferencial en el lavado broncoalveolar

Con la tinción Romanowsky se obtuvieron las siguientes tonalidades en las células: núcleos en general y gránulos de neutrófilos en púrpura, gránulos de eosinófilos en rosa-naranja y eritrocitos en rosa.



En la figura 12 se muestra el conteo de cada tipo celular para los cobayos controles, modelos agudo y crónico. Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos no mostraron cambios estadísticamente significativos con respecto al control y/o al modelo. En el caso de los eosinófilos se observó diferencia estadísticamente significativa en los RA con respecto al grupo control así como a los NRA y RC ($P < 0.05$).

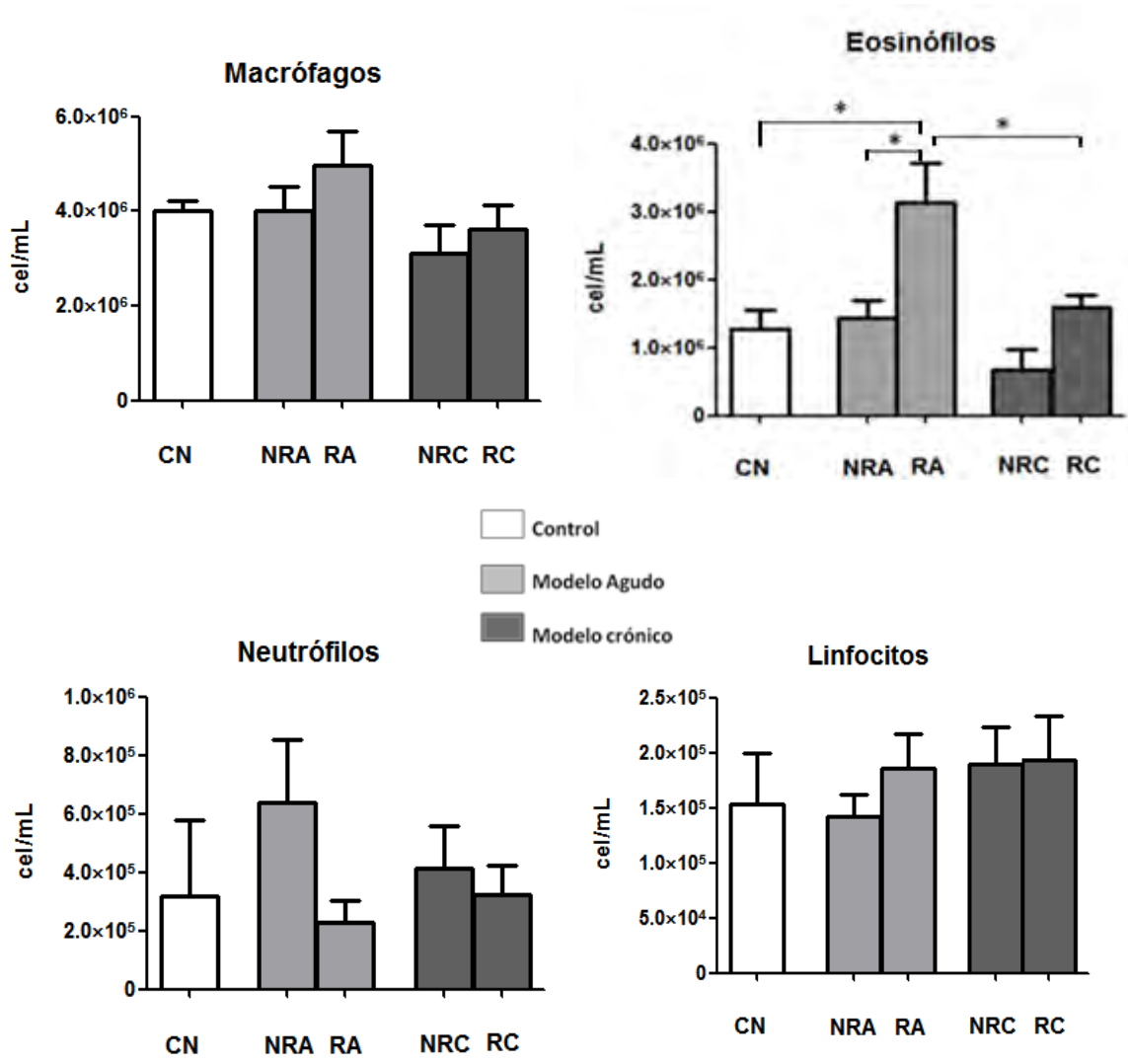


Figura 12. Conteo celular total y diferencial en un modelo de asma alérgica aguda y crónica. NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico. Las barras representan el promedio ± error estándar, con una n=6 por grupo. * $P < 0.05$ (ANOVA de una vía, con la prueba de Tukey).

6.3 Expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ de integrina.

La expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ de integrina en LBA y suero fue detectada por densidad óptica mediante la prueba de ELISA. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. En la figura 13 se muestra la expresión del dominio intracelular y extracelular en las muestras de sobrenadante de LBA y suero, para ambos modelos.

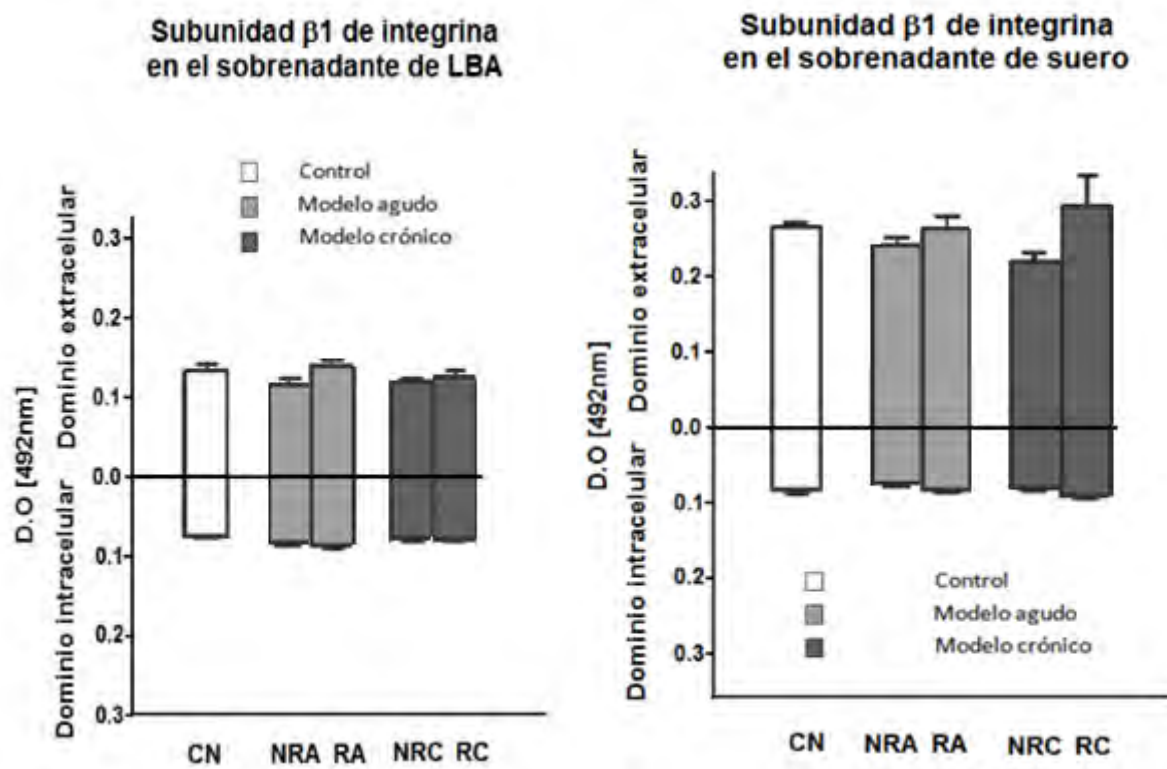


Figura 13. Expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en muestras de sobrenadante de LBA y suero de cobayo. D.O = densidad óptica a 492nm. CN= control, NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico, LBA= lavado broncoalveolar. Las barras representan el promedio de tres ensayos \pm el error estándar, n=6 para cada grupo. Kruskal-Wallis y comparación múltiple con la prueba de Dunns.

6.4 Relación de la expresión entre la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.

La relación entre la expresión de la forma soluble del dominio intracelular con respecto al extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina se muestra en la figura 14. En todos los grupos se observó un incremento en la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular, tanto en sobrenadante de LBA como de suero ($*P < 0.05$). Además de una expresión diferencial del dominio extracelular en el sobrenadante de suero con respecto al LBA, en todos los grupos ($\dagger P < 0.05$).

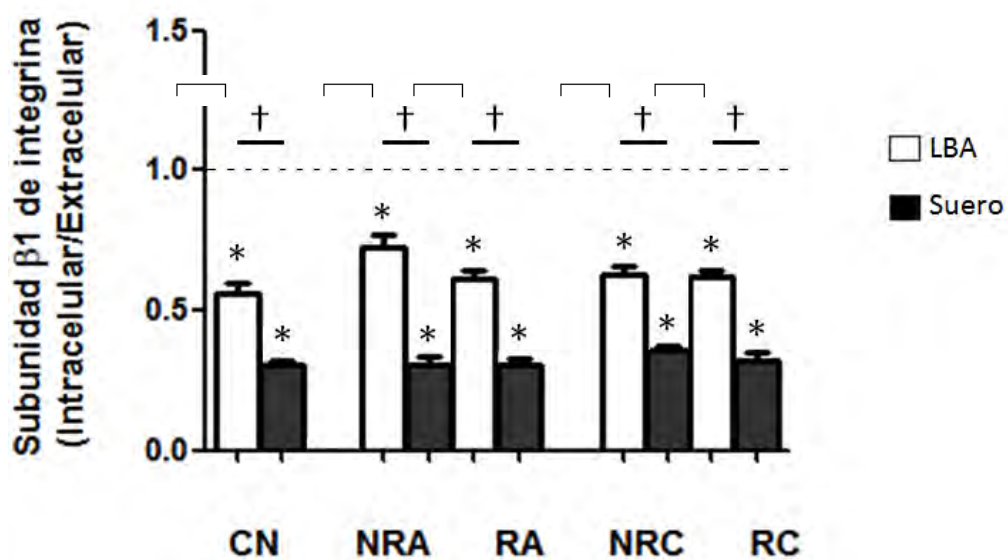


Figura 14. Relación entre la expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero. CN= control, NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico, LBA= lavado broncoalveolar. Las barras representan el promedio \pm el error estándar, $n=6$ para cada grupo. $*P < 0.05$, para las comparaciones entre la expresión del dominio intracelular en relación con el dominio extracelular. $\dagger P < 0.05$ para la comparación entre la expresión de estos dominios entre las muestras de sobrenadante de LBA y suero. Prueba de Wilcoxon.

6.5 Expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina.

La expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina en el sobrenadante de LBA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el sobrenadante de suero, los cobayos No Respondedores en el modelo agudo mostraron un aumento estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($P < 0.05$, $n=6$ por grupo; Fig 15) donde se observó un incremento estadísticamente significativo en el dominio intracelular.

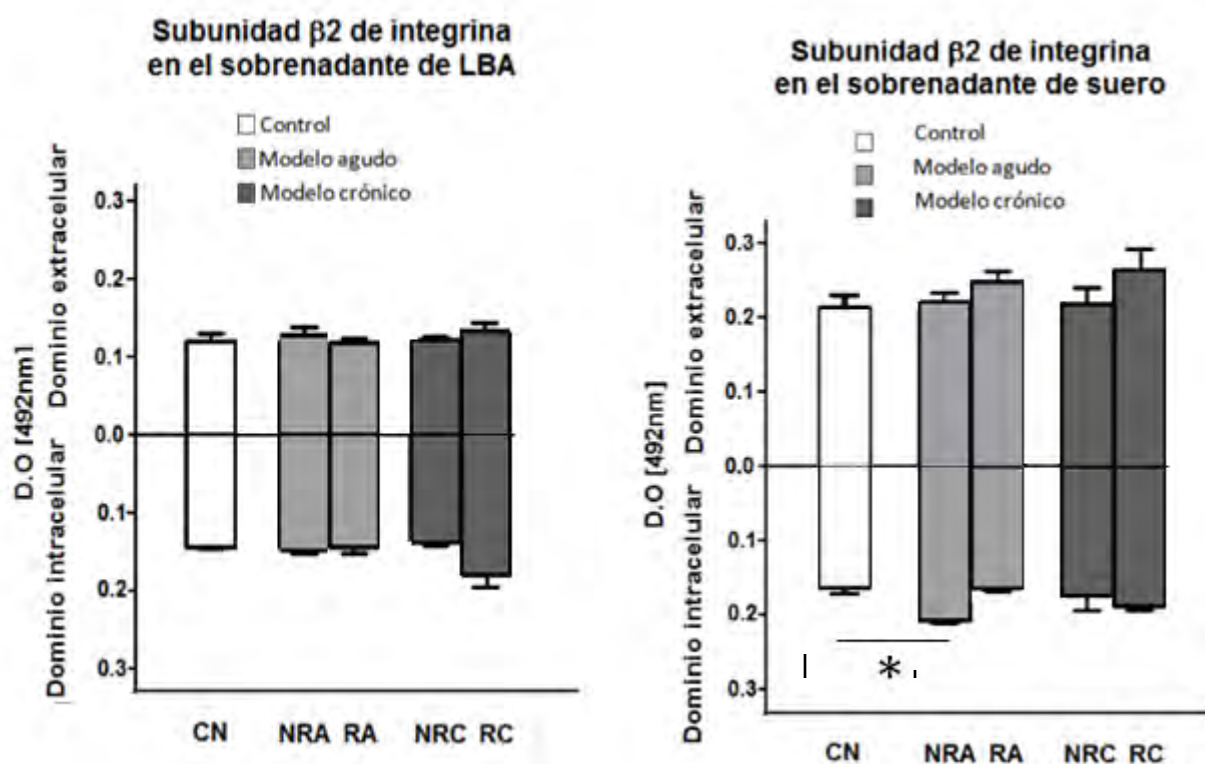


Figura 15. Expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en muestras de sobrenadante de LBA y suero de cobayo. D.O = densidad óptica a 492nm CN= control, NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico, LBA=lavado broncoalveolar. Las barras representan el promedio de tres ensayos \pm el error estándar, $n=6$. Kruskal-Wallis y comparación múltiple con la prueba de Dunns * $P < 0.05$.

6.6 Relación de la expresión entre la forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.

La subunidad $\beta 2$ de integrina muestra un incremento en la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular en sobrenadante de suero. Esto se observa en ambos modelos para el grupo control así como para el grupo de los NRA y los respondedores. Asimismo, se observó expresión diferencial en sobrenadante de LBA y suero en todos los grupos, excepto en el grupo control ($\dagger P < 0.05$, $n=6$, Fig 16).

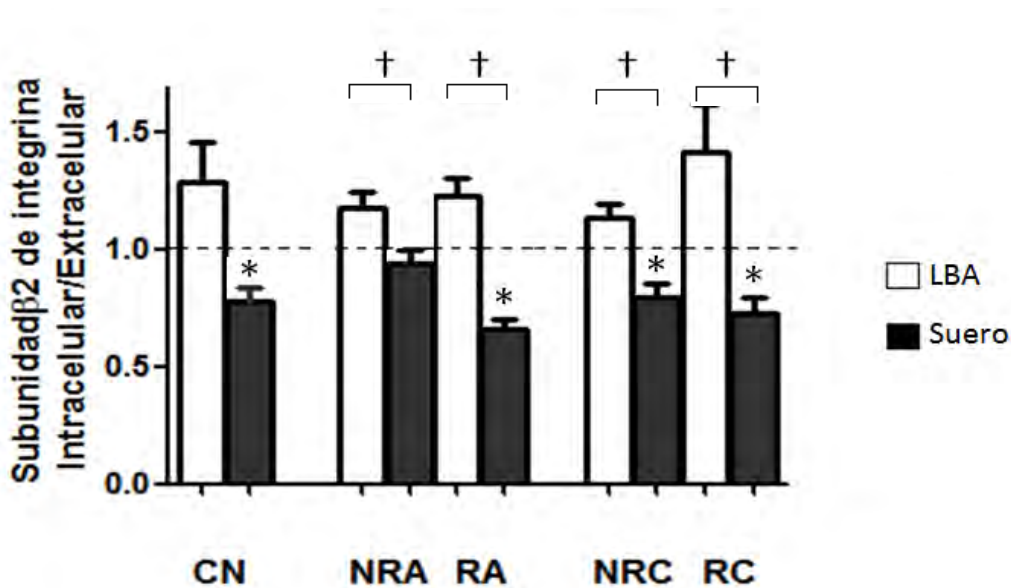


Figura 16. Relación entre la expresión de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero. CN= control, NRA=No respondedor agudo, NRC=No Respondedor crónico, RA= Respondedor agudo, RC= Respondedor crónico Las barras representan el promedio \pm el error estándar, $n=6$ para cada grupo. $*P < 0.05$, para las comparaciones entre la expresión del dominio intracelular en relación con el dominio extracelular, prueba de Wilcoxon. $\dagger P < 0.05$ para la comparación entre la expresión de estos dominios entre el sobrenadante de LBA y suero.

6.7 Relación entre la inflamación y la magnitud de la reactividad de las VA con la expresión de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina.

En la tabla 1 y 2 se muestran los coeficientes de correlación entre el tipo celular infiltrado en las VA y la presencia de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina respectivamente. Se observó una correlación positiva entre los eosinófilos y la presencia del dominio intracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el sobrenadante de LBA (Tabla 1). Para la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina, no se encontró ninguna correlación con el tipo celular (Tabla 2).

Tabla 1. Coeficientes de correlación entre el tipo celular infiltrado en las VA con la presencia de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA.

Forma soluble de la subunidad $\beta 1$ de integrina		
Tipo celular	Dominio intracelular	Dominio extracelular
	Sobrenadante LBA	Sobrenadante LBA
Macrófagos	0.1354	0.1003
Eosinófilos	0.5500*	0.3089
Linfocitos	-0.2254	0.06128
Neutrófilos	0.2189	-0.1423

* $P < 0.01$

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre el tipo celular infiltrado en las VA con la presencia de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA.

Forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina		
Tipo celular	Dominio intracelular	Dominio extracelular
	Sobrenadante LBA	Sobrenadante LBA
Macrófagos	-0.1384	-0.1057
Eosinófilos	0.09489	-0.02569
Linfocitos	0.2659	-0.05237
Neutrófilos	-0.3034	0.3626

En la tabla 3 y 4 se muestra la relación entre el grado de reactividad de las VA con la presencia del dominio intracelular y extracelular de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina, respectivamente. Se encontró una correlación negativa entre el grado de reactividad con la presencia del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, en el sobrenadante de suero (Tabla 3). En el caso de la subunidad $\beta 2$ de integrina, la relación con el grado de reactividad correlaciono con la presencia del dominio intracelular en el sobrenadante de LBA así como con el dominio extracelular en el sobrenadante de suero (Tabla 4).

Tabla 3. Coeficiente de correlación entre el grado de reactividad de las VA con la presencia de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.

Forma soluble de la subunidad $\beta 1$ de integrina				
Grado de reactividad	Dominio intracelular		Dominio extracelular	
	Sobrenadante de LBA	Sobrenadante de suero	Sobrenadante de LBA	Sobrenadante de suero
	0.1039	-0.3368	-0.1903	-0.4241*

Tabla 4. Coeficiente de correlación entre el grado de reactividad de las VA con la presencia de los dominios intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero.

Forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina				
Grado de reactividad	Dominio intracelular		Dominio extracelular	
	Sobrenadante de LBA	Sobrenadante de suero	Sobrenadante de LBA	Sobrenadante de suero
	-0.4598*	-0.2592	-0.1090	-0.6917***

7. DISCUSIÓN

Se ha propuesto que receptores en la superficie de la membrana celular poseen una función importante cuando están presentes como moléculas solubles en fluidos biológicos (Arribas *et al*, 2002). Nuestros resultados muestran a la forma soluble de los dominios extracelulares e intracelulares de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA y suero en un modelo de asma alérgica en el cobayo. Los dominios extracelulares de ambas proteínas en sobrenadante de suero muestran una correlación positiva con el grado de reactividad de las VA, mientras que el dominio intracelular presenta esta correlación únicamente para la subunidad $\beta 2$ de integrina en sobrenadante de LBA, lo que podría significar un papel importante de estas subunidades solubles en el asma.

De acuerdo al plan de sensibilización, desde el primer reto antigénico, la exposición a los aerosoles con OVA indujo una broncoobstrucción inmediata en los cobayos, cuya magnitud triplicó por lo menos el íB basal (Campos *et al*, 2001). Se obtuvieron los dos patrones de respuesta, los R y los NR. Este patrón es observado en la población humana, donde existe gran variabilidad en la manifestación del asma atribuida a factores genéticos, dosis de alérgeno y grado de exposición o sensibilización (Álvarez-Puebla *et al*, 2001). En particular, se ha visto que existen individuos atópicos que no presentan crisis de asma ante la exposición al alérgeno, pero si presentan HVA (Ihre *et al*, 1988 y Custovic y Murray, 2002), características que presentan nuestro grupo de los animales NR. Cockcroft y colaboradores (2006) observaron que estos individuos atópicos que no responden a los retos antigénicos llegan a responder cuando son sometidos a grandes concentraciones de antígeno. Es probable que esto suceda con los cobayos, no obstante consideramos que el estudio de los cobayos que no responden al reto antigénico es un tema interesante de estudio que podría estar relacionado con la tolerancia inmunológica, ya que la expresión o inhibición de proteínas y elementos celulares pueden estar jugando papeles importantes en el tipo de respuesta. Recientemente se ha propuesto la participación de las células T reguladoras, las cuales se han visto disminuidas en los cobayos que responden ante el reto antigénico en comparación con los controles y los cobayos que no responden al reto (Ramos-Ramírez *et al*, 2011).

La HVA es una característica universal que define al asma (Cockcroft *et al*, 2006). Diversos mecanismos han sido sugeridos como desencadenantes. Entre ellos, se piensa que

diferentes procesos inflamatorios son importantes, como es la infiltración de eosinófilos en las VA (O'Byrne *et al*, 2003). Bazán-Perkins y colaboradores (2009), reportaron que desde el primer reto antigénico hubo incremento en la reactividad de las VA, así como en el número de neutrófilos y eosinófilos en cobayos con modelo de asma, ambas características persistiendo en el modelo crónico. En el presente estudio observamos eosinofilia únicamente en los cobayos respondedores para el modelo agudo, sin embargo esta característica no persistió para el modelo crónico, contrario a lo que reporta Moreno-Álvarez en el 2010, en el cual la eosinofilia se mantiene. Sin embargo, una diferencia significativa es que los cobayos estudiados por Moreno-Álvarez fueron eutanizados inmediatamente después del reto antigénico, mientras que en este estudio, se llevó a cabo 24 horas posterior al reto, por lo que el número de células inflamatorias presentes en el LBA pudo haber disminuido. Durham y Kay (1985) observaron que la eosinofilia a las 24 h se relaciona con la respuesta alérgica tardía posiblemente por la respuesta de la médula ósea al reclutamiento de eosinófilos y por lo tanto su disminución a las 24 h. Es importante mencionar que el grupo NR no presenta obstrucción de las VA tardía, por lo que la eosinofilia no está determinando la presencia de respuesta tardía en nuestro modelo.

Bazán-Perkins y colaboradores reportaron la expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina de forma acelular en un modelo de asma alérgica en cobayos. Reportaron la sobreexpresión de esta proteína en la región subepitelial de las VA, mostrando una correlación directa con el grado de reactividad de las VA. Posteriormente, en un estudio realizado en nuestro laboratorio (Álvarez-Santos, 2011), se detectó el dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en el intersticio del músculo liso de las VA, siendo el dominio intracelular el que mostraba una correlación directa con el grado de reactividad de las VA. Esta forma no celular de las integrinas podría tener un papel importante en el asma por lo que detectarla en fluidos como LBA y suero podría ser utilizada como un método no invasivo para detectar la severidad del asma. En este estudio se detectó a la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina, en sobrenadante de LBA y suero siendo significativamente mayor en este último. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos. La forma soluble del dominio extracelular ha sido anteriormente reportada en el intersticio del músculo cardíaco (Ding *et al*. 2000, Goldsmith *et al*. 2003) y en pericondrio de ratón durante la condrogénesis

(Shakibaei M. *et al*, 1995), así como la forma soluble de la subunidad $\alpha 2$ en suero humano, la cual únicamente se encuentra en asociación con la subunidad $\beta 1$ de integrina (Bank *et al*, 1999). En nuestro estudio se encontró una asociación inversa entre la forma soluble del dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina en sobrenadante de suero, con el grado de reactividad de las VA. Estos datos sugieren que la forma soluble podría estar relacionada con la gravedad de la enfermedad. Sumado a esto, se obtuvo una correlación positiva entre el número de eosinófilos con el dominio intracelular de la forma soluble de la subunidad $\beta 1$ de integrina. Esto nos sugiere que durante la transmigración de eosinófilos, el dominio intracelular podría estar siendo liberado. Anteriormente se han utilizado anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 1$ observando su papel en el tráfico de leucocitos hacia los sitios de inflamación, reduciendo la eosinofilia pulmonar y los niveles de citocinas IL-4 y IL-5 en LBA (Fernandes *et al*, 2006).

El análisis de las diferencias entre la expresión del dominio intracelular y extracelular sugiere que no se está detectando la misma proteína con los anticuerpos dirigidos hacia los diferentes dominios. En la subunidad $\beta 1$ de integrina, en todos los grupos y en ambas muestras, el comportamiento fue similar, encontrando una mayor cantidad del dominio extracelular con respecto al intracelular. Esto podría indicar que el mecanismo principal por el cual se está liberando este dominio es mediante corte proteolítico. Este representa un novedoso e interesante mecanismo por el cual las interacciones de las células pueden ser moduladas. Este ha sido anteriormente descrito en otros tejidos diferentes de las VA. El primer reporte fue hecho en 1995 por Shakibaei y col., quienes detectaron la presencia de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de integrina en matriz de cartílago, en esbozos de miembros de ratón (Shakibaei M. *et al*, 1995). Este corte proteolítico se ha asociado también a condiciones patológicas, como el caso de la hipertrofia cardiaca y la transición temprana hacia la insuficiencia cardiaca (Ding B. *et al.*, 2000, Goldsmith *et al.* 2003). El corte del dominio intracelular ha sido menos estudiado, sin embargo hay reportes de que el corte de este dominio incrementa la apoptosis en miocitos cardiacos, tal vez mediado por la MMP-2 (Menon *et al.*, 2006). Además, el fragmento cortado podría unirse a las células o a componentes de matriz extracelular y estar involucrado en eventos de señalización biológica, de crecimiento celular o de remodelación, aunque su papel fisiológico aún no está bien definido (Goldsmith *et al.* 2003).

Hasta ahora, se han identificado 5 variantes de la subunidad $\beta 1$ ($\beta 1_A$, $\beta 1_B$, $\beta 1_C$, $\beta 1_{C-2}$ y $\beta 1_D$). El anticuerpo utilizado en este trabajo solo reconoce a la variante $\beta 1_A$, esta es abundantemente expresada en todos los tejidos. Las otras variantes son generalmente coexpresadas con $\beta 1_A$ y es la única que se ha encontrado en otras especies distintas del humano (de Melker *et al*, 1999).

Tanto el dominio extracelular como intracelular de la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina fueron detectados en el sobrenadante de LBA y suero. En el presente trabajo, se reporta por primera vez el dominio intracelular no asociada a la célula. Este fragmento al estar soluble podría inhibir la traducción de señales en las células e impedir la trans migración. El dominio extracelular mostró una asociación inversa con el grado de reactividad de las VA, en el sobrenadante de suero, mientras que el dominio intracelular mostró esta asociación inversa en sobrenadante de LBA, lo que nos sugiere una participación de la forma soluble de la integrina en el desarrollo de la enfermedad.

Las diferencias entre la expresión del dominio extracelular e intracelular en la subunidad $\beta 2$ de integrina mostró un comportamiento distinto en LBA y suero. En suero se encuentra elevado el dominio extracelular, mientras que en el LBA la tendencia es al incremento del dominio intracelular. Estos datos nos sugieren que al encontrarse principalmente el dominio intracelular el mecanismo predominante por el que podría estar siendo liberada la forma soluble de la subunidad $\beta 2$ es el empalme alternativo, ya que en este ambos dominios son liberados de la célula. Este mecanismo se ha reportado como un regulador de la actividad de las integrinas (de Melker *et al*, 1999). Estas secuencias alternativas en el dominio extracelular, pueden tener varios efectos en la función de las integrinas, pues pueden proveer diferentes sitios de unión a ligando, la cual puede resultar en distintas especificidades para el ligando y señales intracelulares. Igualmente podrían adoptar diferentes conformaciones que afectan el estado de activación y por lo tanto su afinidad, también podrían intervenir en la heterodimerización y regular el nivel en el cual las integrinas son expresadas en la superficie celular. Las variantes del dominio intracelular, podrían activar diferentes vías de señalización y resultar en distintas respuestas celulares, así como afectar la afinidad de unión a ligando, la distribución sobre la superficie membranal en el caso de la subunidad β (Fornaro M. *et al*, 1997).

La expresión diferencial de ambos dominios no se obtuvo en el control, lo que sugiere que estas formas solubles tienen un papel en la inflamación de las VA. Anteriormente se sugirió que la forma recombinante y soluble de la subunidad $\beta 2$ de integrina podría ser útil como anti-inflamatorio, ya que no pierde sus propiedades de unión al ligando. (Nava *et al*, 1991). En el 2011 se identificaron niveles aumentados de integrina $\beta 2$ bajo condiciones inflamatorias, sugiriendo una posible función en el tráfico de leucocitos. Recientemente se ha detectado esta forma soluble de la subunidad $\beta 2$ como parte de la inflamación sinovial en la artritis reumatoide y espondiloartritis. Estos autores además demostraron la habilidad de la integrina soluble para inhibir la adhesión a ICAM-1 (Gómez *et al.*, 2011).

Una mayor detección de la forma soluble de ambas subunidades de integrina en suero puede deberse principalmente al mayor número de células y por lo tanto una mayor fuente de donde pudieran provenir estas formas solubles. Sumado a esto, las células inflamatorias pierden estas moléculas de adhesión cuando se da la transmigración del torrente sanguíneo hacia la zona de inflamación, como se describe en un modelo *in vivo* en humanos (Evans *et al*, 2006, Hemler, 2006).

Medir la reactividad de las VA podría ser suficiente para hacer un diagnóstico de asma, particularmente en pacientes con síntomas que son consistentes con la enfermedad (O'Byrne *et al.*, 2003). El método de ELISA puede ser adecuado para la detección de la forma soluble de las subunidades de integrina, ya que únicamente se obtuvieron datos positivos en las muestras de LBA y suero, no así en los controles negativos (OVA y muestra sin anticuerpo primario). Además la densidad óptica obtenida fue dependiente de la cantidad de anticuerpo. Las desventajas de este ensayo es que no podemos determinar el peso molecular de cada subunidad β . Anteriormente se reportó (Álvarez-Santos, 2011), por medio de Western Blot distintas bandas tanto en miocitos como en tejido conectivo de la subunidad $\beta 1$ de integrina, y solo algunas de ellas mostraban un incremento significativo en el modelo de asma con respecto al control, por lo que en la forma soluble sería necesario identificar si esta diferencia significativa persiste. De igual manera se necesita determinar a qué subunidad α se encuentran unidas las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, ya que las integrinas acelulares que se han reportado, permanecen como heterodímeros (Dana N. *et al*, 1991), además de determinar si existen sustancias en los fluidos biológicos que pudieran enmascarar la detección de estas formas solubles en el ensayo de ELISA.

En conclusión, futuros experimentos son necesarios para clarificar la función de estas formas solubles y utilizarlas como un método no invasivo para la ayuda en el diagnóstico del asma.

8. CONCLUSIONES

Las integrinas solubles $\beta 1$ y $\beta 2$ se expresan de forma constitutiva en todos los grupos tanto en sobrenadante de lavado broncoalveolar como de suero, sin embargo, el desarrollo de la reactividad de las VA mostró una asociación inversa con la expresión de ambos dominios de la subunidad $\beta 2$ de integrina, así como con la expresión del dominio intracelular de la subunidad $\beta 1$ de integrina. Esto sugiere que la expresión de ambas subunidades de β integrina tienen un papel importante para el desarrollo de la HVA. Por esta razón, las formas solubles de $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina podrían ser útiles como herramienta terapéutica para detectar el grado de HVA y por lo tanto, indicar la magnitud de la severidad del asma.

REFERENCIAS

1. Álvarez-Santos, MD, 2011. 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 para Maestría en ciencias biológicas). México D.F: Facultad de Medicina, UNAM.
2. Anderson, D.C., and Springer, T.A., 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med.* **38**:175-94.
3. Arribas, J., and Borroto A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev.* **102**(12):4627-38.
4. Bank, I., Weiss, P., Doolman, R., Book M. and Sela B. 1999. Detection of soluble $\alpha 1$ integrin in human serum. *J Lab Clin Med.* **134**(6):599-604.
5. Barczyk, M., S. Carracedo, D. Gullberg. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**(1):269-80.
6. Barreiro, O., and Sánchez-Madrid. 2009. Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria *Revista Española de Cardiología* **62**(5)552-562.
7. Bazán-Perkins B., E. Sánchez-Guerrero, M.H. Vargas, E. Martínez-Cordero, P. Ramos-Ramírez, M. Alvarez-Santos, G. Hiriart, M. Gaxiola, and R. Hernandez-Pando. 2009. Beta1-integrina shedding in a guinea pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy* **39**:740-751.
8. Bazan-Perkins, B., Vargas, M.H., Sanchez-Guerrero, E., Chavez, J. & Montano, L.M. 2004. Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental Physiology*, **89**;(5)623-628.
9. Bergeron, C., and L.P. Boulet. 2006. Structural changes in airway diseases. *Chest* **129**; 1068-1087.
10. Belkin, A.M. and Retta, S.F. 1998. B1D integrin inhibits cell cycle progression in normal myoblast and fibroblast. *J. Biol. Chem* **273**:15234-15240.
11. Boulet, L.P., MD. 2003. Physiopathology of Airway Hyperresponsiveness. *Current Allergy and Asthma Reports*; **3**:166-171.
12. Bousquet, J., P.K. Jeffery, Busse, W., Johnson, M., and Vignola, A., 2000. From Bronchoconstriction to airways inflamatiuos and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*; **161**:1720-1745.
13. Campos, M.G., Tortoriello, J., Oropeza, M.V., Ponce, H., Vargas, M.H. and Montaña LM. 2001. Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD4-induced contraction in guinea pig airways. *Ethnopharmacol*; **74**: 7-15.

14. Chávez, J., Montaña, L.M., Sommer, B., Gustin, P. and Vargas, M.H. 1996. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Neumol Cirugía Tórax* **55**, 49–54.
15. Cockcroft, D.W., Killian, D.N., Mellon, J.J.A, and Hargreave, F.E. 1997. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clinical Allergy* **7**:235-243.
16. Cockcroft, D.W., FRPC, M.D and Davis B.E., 2006. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immuno* **118**(3):551-9.
17. De Melker, A.A., and Sonnenberg, A. 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays*. **21**(6):499-509.
18. Ding, B., Price, R.L., Goldsmith, E.C., Borg, T.K., Yan, X., Douglas, P.S., Weinberg, E.O., Bartunek, J., Thielen T., Didenko, V.V., and Lorell, B.H., 2000. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation* **101**:2854-2862.
19. Douglas, M., Anderson, J.K., Patricia D.N., and Michelle A.E. 1999. Diccionario Mosby-Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud, Ediciones Hancourt, S.A., 2411p.
20. Drorbaugh, J.E., and Fenn, W.O. 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**:81–87.
21. Durham, S.R., and Kay B., 1985. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clinical Allergy* **15**;411-418.
22. Elaine, N.M., and H. Katja. 2010. Human anatomy & physiology. Octava edición Pearson, 1114p.
23. Evans, B.J, McDowall, A. Taylor, P.C., Hogg, N., Haskard, D.O., and Landis C. Shedding of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in a human inflammatory response. *Blood*. **107**(9):3593-3599.
24. Fernandes, D.J., J.V. Bonacci, and A.G. Stewart. 2006. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets* **7**(5):567-77.
25. Fornaro, M. and Languino L.R. 1997. Alternatively spliced variants: A new view of the integrin cytoplasmic domain. *Matrix Biol.* **16**(4):185-93
26. Giancotti, F. and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* **285** (5430): 1028-1033.
27. Global strategy for Asthma Management and Prevention (GINA) [página de internet]. USA [actualizado 2011 Diciembre; citado 2011 26 de Septiembre] Disponible en <http://www.ginaasthma.org> 2-13.

28. Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne, and J. Kuby. 2003. *Immunology*. 5ª Edición W. H. Freeman and Company. Nueva York, 603p.
29. Goldsmith, E.C., Carver W., McFadden, A., Goldsmith J.G., Price R.L., Sussman, M., Lorell B.H., Cooper, G., and Borg T.K. 2003. Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H2227-2234.
30. Gomez I.G., Tang J., Wilson C.L., Yan W., Heinecke J.M., Harlan J.M., Raines E.W. 2011. Metalloproteinase-mediated shedding of integrin β 2 promotes macrophage efflux from inflammatory sites. *J Biol Chem* **287**(7):4581-9.
31. Hamelmann E., Schwarze J., Takeda K., Oshiba A., Larsen G.L., Irvin C.G. 1997. Noninvasive Measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Care Med*, **156**:766-775.
32. Heaney M., L. Mark, and D.W. Golde. 1998. Soluble receptors in human disease. *Journal of Leukocyte Biology* 64:135-146.
33. Hemler, M.E. 2006. Shedding of heterodimeric leukocyte integrin. *Blood* **107**:3417-3418.
34. Holgate, S., and D. Davies. Rethinking the Pathogenesis of Asthma 2009. *Cell Press Immunity Essay* **31**:362-367.
35. Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliot W.M., Buzaru, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciruba, F.C., and Coxson, H.O., 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **350**:2645-53.
36. Humpries M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:311-339.
37. Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**(6):673-87.
38. Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado [página de internet]. México [actualizado 2009 29 de Junio; citado 2011 26 de Septiembre] Disponible en http://www.issste.gob.mx/www/issste/documents/informacioninstitucional/IFA_FINAL_junta_directiva.pdf.
39. Instituto Mexicano del Seguro Social [página de internet]. México [actualizado 2012 13 de Marzo; citado 2011 26 de Septiembre] Disponible en <http://www.imss.gob.mx/SiteCollectionDocuments/migracion/prensa/Comunicados2009/291009Com321.pdf>
40. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias [página de internet]. México [actualizado 2010 28 de Septiembre; citado 2011 26 de Septiembre] Disponible en: http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/acerca_asma.html.
41. Kagami, S. and Kondo, S. 2004. Beta1-integrins and glomerular injury. *The journal of medical investigation* **51**, 1-13.

42. Kim, H.Y., H. Rosemarie, I. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* **11.7**:577-584.
43. Leff, R.J., Kimm, Hamann, and Wegner C. 1991. Inflammation and cell-cell interactions in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol.* **260**(4 Pt 1):L189-206.
44. Moreno-Alvarez, P., Sánchez-Guerrero, E., Martínez-Cordero, E., Hernández-Pando, R., Campos, M.G., Cetina, L., Bazán-Perkins, B. 2010. Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung.* **188**(2):97-105.
45. Nava, D., Fathallah, D.M., and Arnaout A. 1991. Expression of a soluble and functional form of the human $\beta 2$ integrin CD11b/CD18. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:3106-3110.
46. O'Byrne, M.D. 2003. Airway hyperresponsiveness. *Chest Suppl* **123**:411S-416S.
47. O'Byrne PM., 2010. Introduction: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance." *Chest* **138.2** Suppl: 1S-3S.
48. O'Byrne, P.M., and Mark D.I. 2003. Airway hyperresponsiveness. *Chest* **123.3** Suppl 411S-6S.
49. Pearce, N.J., Pekkanen, and R. Beasley. 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* **54**(3):268-272.
50. Rabinovich, G.A. 2004. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Primera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004.
51. Ramos-Ramírez, P., Tellez, O., Martínez, E., García, E., Gutierrez, F., and Bazán B. 2011. Naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg cells are related to the absence of antigen induced airway obstruction in a guinea pig asthma model. *Eur Resp J.* **38**(581s).
52. Roa, F., S. Toral, V. Roa, J. Zavala, L. Durán, B. Herrera, and F. Fuentes. 2009. Estimaciones sobre la tendencia del asma en México para el periodo 2008-2012. *Asociación Médica Centro Médico ABC* **54**:16-22.
53. Shakibaei M., Zimmermann B., Merker HJ., 1995. Changes in integrin expression during chondrogenesis *in vitro*: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem*; **43**:1061-9.
54. Sell, S. 2001. Immunology, immunopathology and immunity. Sexta edición Washington D.C., Asm Press. 753p.

55. Sommer, B. Vargas, M.H, Chávez J., Carbajal V., Segura P., and Montaña L.M. 2001. Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O₃-induced hyperresponsiveness. *J Appl Physiol* **91**:2595-601.
56. Sheppard, D., 2000. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix biology journal of the International Society for Matrix Biology* **19**(3):203-209.
57. Takada, Y., X. Ye, and Simon, S. 2007. The Integrins. *Genome Biol.* **8**(5):215.
58. Tresguerres, J.A-F. 1992. Fisiología humana. Madrid Interamericana, Mc Graw Hill, 1216 p.
59. West, J.B. 2000. Fisiología respiratoria. Sexta edición EUA, Panamericana, 192p.
60. Woolcock, A.J., Salome C.M. , and Yan K. 1984. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* **130**(1):71-5.
61. Youker K.A., Beirne J., Lee J., Michael L.H., Smith C.W., Entman M.L. 2000 Time-dependent loss of Mac-1 from infiltrating neutrophils in the reperfused myocardium. *J Immunol.* **164**(5):2752-8.