



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO*

*FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES*

*Cambios en la expresión de Sca-1 en el epitelio
de la vía aérea inducido por histamina*

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:

Gabriela Gutiérrez Olguín

TUTOR:

Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins



MÉXICO

2014.



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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Eduardo García Zepeda

Vocal: Dra. Lourdes Segura Valdéz

Secretario: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

1er. Suplente: M. en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez

2do. Suplente: Dra. Mayra Dinorañ Santos

Sítio donde se desarrolló el tema:



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

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecerle a Dios por haberme dado la capacidad de terminar este trabajo de tesis y la carrera, pero sobre todo por haberme puesto a mi familia y amigos; sin duda fueron un gran apoyo durante este proceso.

En mi familia:

A mis padres, porque siempre me han apoyado en todo, pero sobre todo por su cuidado y amor incondicional; a mis abuelitos Víctor y Magda, su hogar siempre será un refugio para mí; a mi familia de la Zarza, gracias por sus oraciones y apoyo; a mis weros, sin todos los momentos nada profundos de risa me habría vuelto loca.

En el INER:

Gracias a mi tutora por haberme impulsado y apoyarme, al Dr. Miguel O. Gaxiola Gaxiola, jefe del laboratorio de Morfología del INER por haberme permitido trabajar ahí; a todas las personas que hicieron mis mañanas divertidas, sin ellas sin duda habría sido muy pesado el proceso experimental; al Dr. Jasso, sin su oración de la santa inmunohistoquímica nunca habría salido la tesis; a mi amigo y tutor Carlos (Carlitos), por enseñarme y tolerar mis estreses. De manera muy especial a Guadalupe Hiríart (Lupi), Erika Monterubio y Jaime Hernández, sin ustedes definitivamente no hubiera podido realizar el trabajo en el laboratorio. Gracias por enseñarme y apapacharme tanto. Este trabajo también es de ustedes.

Y a todos aquellos que me brindaron su apoyo y amistad a lo largo de la carrera, tanto dentro como fuera de la Facultad. Los amo.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	6
<i>1. Introducción</i>	7
<i>1.1. Las vías aéreas</i>	7
<i>1.2. Reparación Celular en el epitelio de las vías aéreas</i>	10
<i>1.3. Vías de reparación alternas en la vía aérea</i>	13
<i>1.4. Histamina</i>	16
<i>1.5. Restitución Epitelial</i>	17
<i>1.6. Sca-1</i>	18
<i>1.7. Expresión de Sca-1</i>	19
<i>1.8. Expresión de Sca-1 en pulmón</i>	20
<i>1.9. Expresión de Sca-1 asociada con la edad</i>	21
<i>2. Justificación</i>	23
<i>3. Hipótesis</i>	23
<i>4. Objetivos</i>	23
<i>4.1. Objetivo general</i>	23
<i>4.2. Objetivos específicos</i>	23
<i>5. Metodología</i>	24
<i>5.2. Animales y pletismografía barométrica</i>	25
<i>Inmunohistoquímica</i>	23
<i>5.3. Conteo Celular y estadística</i>	27

6. Resultados.....	28
<i>Reactividad de las vías aéreas.....</i>	<i>28</i>
6.2. <i>Expresión de Sca-1 en el epitelio de las</i> <i>vías aéreas del cobayo.....</i>	<i>28</i>
6.3. <i>Efecto de la histamina en la expresión</i> <i>de Sca-1 en bronquiólos de cobayo.....</i>	<i>30</i>
6.4. <i>Efecto de la histamina en la expresión</i> <i>de Sca-1 en bronquios de cobayo.....</i>	<i>33</i>
7. <i>Discusión.....</i>	<i>33</i>
8. <i>Conclusiones.....</i>	<i>39</i>
9. <i>Bibliografía.....</i>	<i>40</i>

Resumen

Introducción: Las células epiteliales son la primera línea de defensa contra los patógenos y partículas inhaladas, por lo que son muy susceptibles al daño. Este epitelio es capaz de auto-repararse y así restituir su estructura mediante la participación de células indiferenciadas (madre o progenitoras) y células diferenciadas. El antígeno de células madre 1 (Sca-1) es un marcador común de las células reparadoras que pueden regenerar al epitelio. La histamina, una amina liberada durante las reacciones alérgicas, puede dañar la estructura celular, pero se desconoce su efecto en los procesos de reparación celular. Nuestra **hipótesis** es que la histamina puede alterar la expresión de Sca-1 en la vía aérea.

Objetivo: Determinar el efecto de la inhalación de histamina en la expresión de Sca-1 en las vías aéreas del cobayo.

Metodología: La expresión de Sca-1 (mediante inmunohistoquímica) se determinó en epitelio y músculo liso de las vías aéreas (MLVA) de cobayos machos jóvenes de 2 meses (C2) y maduros de 5 meses (C5) tratados con histamina nebulizada.

Resultados: Los C2 y C5 no mostraron cambios en el número de células positivas Sca-1 en el epitelio y MLVA bronquial y bronquiolar. Así mismo, la histamina no modificó el número de células Sca-1 positivas en los bronquios de los C2 ni en los bronquiolos de los C5; no obstante, en los bronquiolos de los C2 la histamina indujo un incremento significativo ($p < 0.05$; comparado con el control) en el número de células que expresan Sca-1, mientras que en los bronquios de los C5 hubo una disminución también significativa ($p < 0.05$; comparado con el control) de de éstas células. Adicionalmente, también se observó que el MLVA de los C2 expresan Sca-1, y que esta expresión no se modificó por histamina; sin embargo la expresión de Sca-1 de C5 es muy baja y desaparece en los animales tratados con histamina.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la histamina podría alterar a las células responsables de los procesos de reparación. Es probable que la edad del cobayo sea un factor importante en la susceptibilidad al efecto de la histamina en las células Sca-1 positivas dependiendo del tejido.

1. Introducción

1.1 Las vías aéreas

Para facilitar su estudio el sistema respiratorio se divide en dos: las vías aéreas superiores y las vías aéreas inferiores (Rogers, 2011).

Las vías aéreas superiores están compuestas por la nariz y las cavidades paranasales, la faringe o garganta, parte de la cavidad oral y la laringe; mientras que las inferiores comprenden a la tráquea, bronquios, bronquiolos, y a los conductos alveolares (Figura 1).

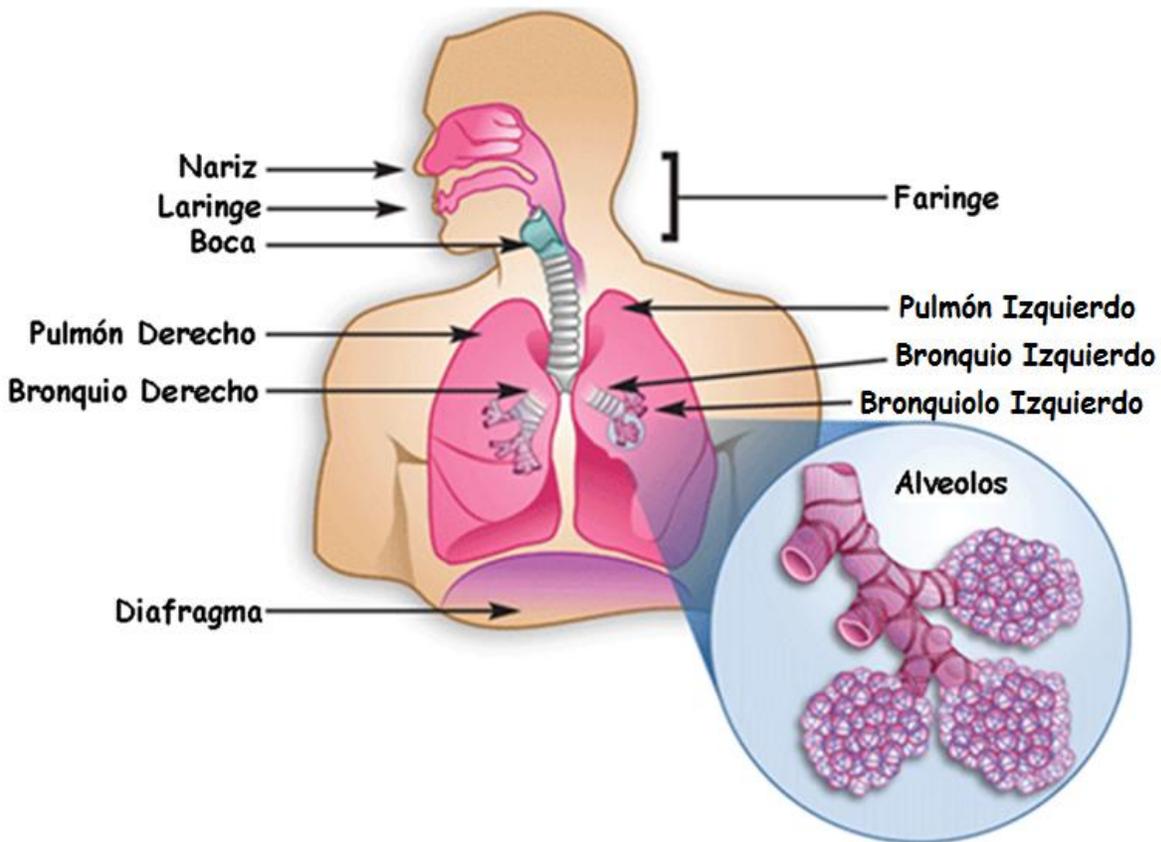


Figura 1. Imagen del sistema respiratorio humano. Modificado de NIAAA Publications.

La vía aérea superior es la encargada de filtrar y calentar el aire cuando éste entra al tracto respiratorio. Este proceso de filtrado es sumamente importante ya que ayuda a limpiar el aire del polvo y otras partículas que de llegar al pulmón podrían lastimarlo o incluso dañarlo.

La vía aérea inferior posee en su parte dorsal fibras de músculo liso transversal (Rogers, 2011) y en su interior, junto con los bronquios, el epitelio típico descrito en la siguiente tabla.

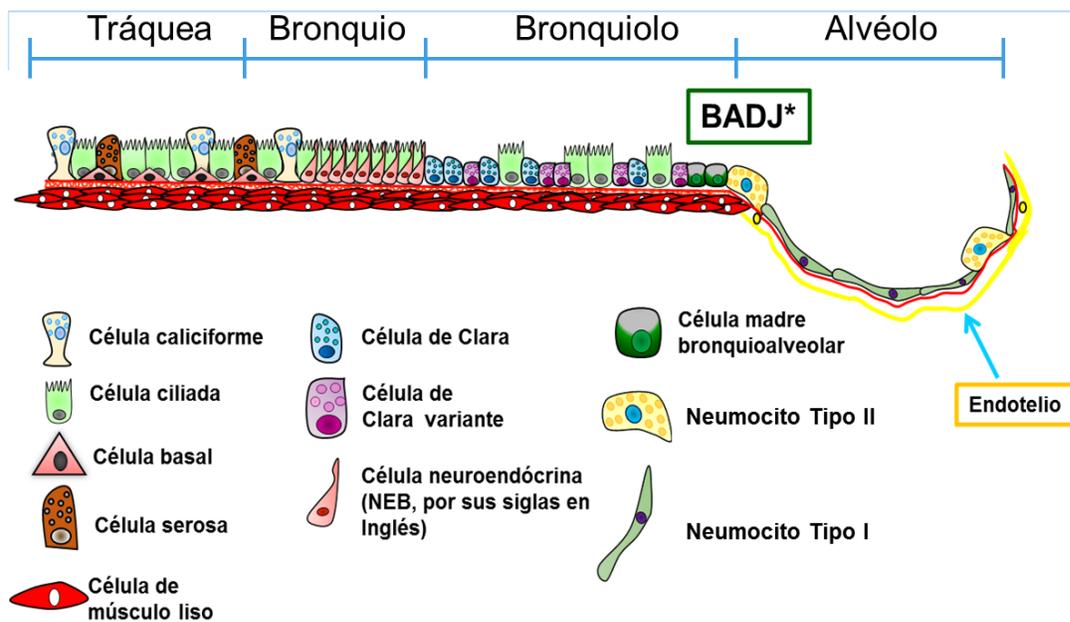
Tabla 1. Células que componen el epitelio típico de la vía aérea inferior.

Tipo Celular	Generalidades
<i>Células basales</i>	<i>dividen al epitelio</i>
<i>Células neuroendócrinas:</i>	<i>contienen muchos gránulos neurosecretores</i>
<i>Células ciliadas</i>	<i>llevan cilios compuestos por 9 pares de axonemas y se encargan del anclaje al citoplasma y del movimiento ciliar</i>
<i>Células peine</i>	<i>su función aún no es clara</i>
<i>Células caliciformes</i>	<i>contienen numerosos gránulos secretores de mucosa</i>
<i>Células serosas</i>	<i>contienen gránulos secretores pequeños y cuyos electrones son oscuros</i>
<i>Células de Clara</i>	<i>también contienen gránulos secretores pero cuyos electrones son lúcidos (Mathew, 2007)</i>

Cabe mencionar que la vía aérea inferior es la encargada de proveer de un canal para que el aire pueda pasar a los pulmones y éstos últimos reciben ese aire y facilitan el proceso de intercambio gaseoso (Rogers, 2011).

Conforme se ramifican los conductos a lo largo del pulmón, los bronquios se dividen 10 u 11 veces, y gradualmente pierden sus piezas cartilaginosas hasta convertirse en bronquiolos y alveolos (Radivoj, 1997). En este proceso el epitelio sufre una serie de cambios que conllevan a que haya una transición de un epitelio pseudoestratificado a uno columnar, en donde las células ciliadas se vuelven menos numerosas y las glándulas desaparecen de manera gradual. Las células de Clara usualmente se ven esparcidas entre las células ciliadas y pueden llegar a proyectarse en el lumen de la vía aérea. Estas células contribuyen al forraje de la superficie de los bronquiolos.

Conforme se profundizan los bronquiolos, aumentan el número de alveolos en la vía aérea, y aproximadamente en la tercera división podemos encontrar los ductos alveolares, los cuales se encuentran totalmente forrados por células alveolares tipo I (George *et. al*, 2005), que son las que proveen la superficie para el intercambio de gases (Rawlins y Hogan, 2006), y junto con las células alveolares tipo II, que son células cuboidales que contienen cuerpos laminares llenos de material surfactante (Rawlins y Hogan, 2006), conforman el epitelio típico alveolar.



*Unión bronquioalveolar (BADJ, por sus siglas en inglés)

Figura 2. Epitelio de vía aérea distal y proximal. Modificado de Springer Images.

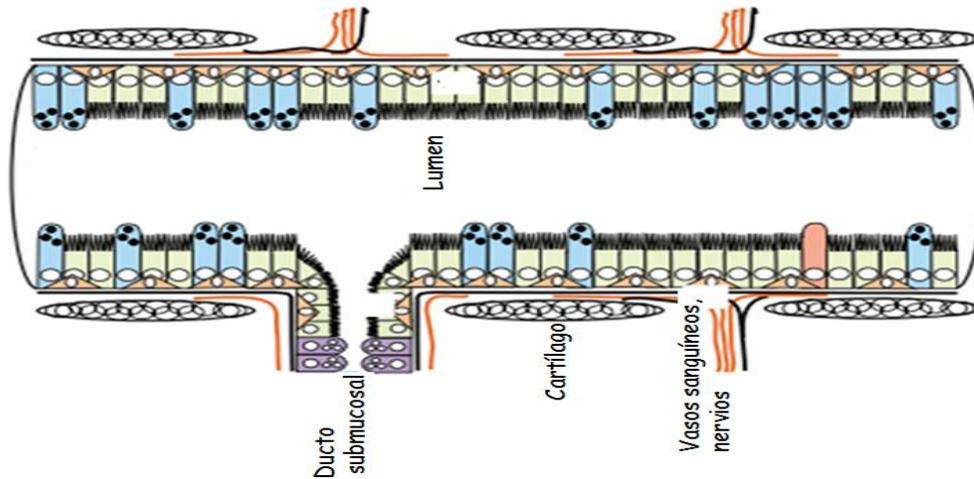


Figura 3. Epitelio de tráquea y bronquios principales. En azul, células de Clara; en verde, células cilíadas; en rosa, células neuroendócrinas; en naranja, células basales; y en morado, células mucosas (caliciformes). Modificado de Rawlins y Hogan, 2006.

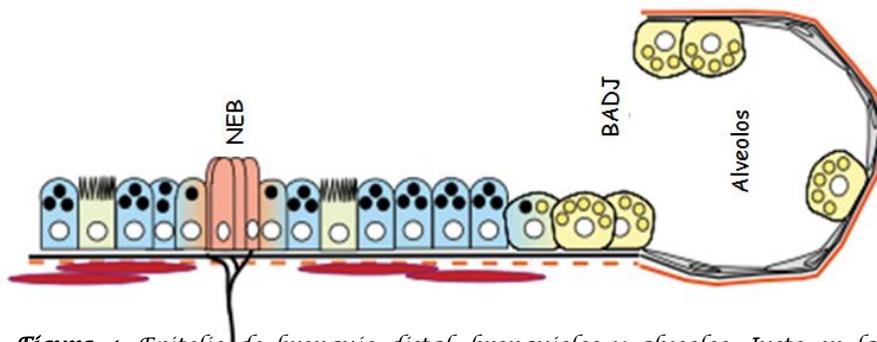


Figura 4. Epitelio de bronquio distal, bronquiolos y alveolos. Justo en la unión del ducto bronquio alveolar se puede apreciar de color amarillo, a las células alveolares tipo II; de color verde, a las células cilíadas; de color gris, a las células alveolares tipo I; de color rosa, a los cuerpos neuroendócrinos (NEBs, por sus siglas en inglés); y las células de músculo liso en color rojo. Modificado de Rawlins y Hogan, 2006.

1.2. Reparación celular en el epitelio de las vías aéreas

Como hemos visto la estructuración celular de las vías aéreas es sumamente compleja, y más aún cuando éstas se encuentran expuestas de manera constante a agentes tóxicos, partículas, y patógenos del ambiente. Por lo tanto, aunado a todas esas funciones particulares para llevar a cabo el proceso de respiración también tienen que ser capaces de responder de manera rápida y eficaz al daño celular; este daño celular incluye la producción local de inmuno-citocinas y otras moléculas propias de la

respuesta inmunológica que se da por parte del cuerpo. Es por eso que se ha propuesto que en el epitelio de las vías aéreas existen dos tipos celulares que son sumamente importantes para llevar a cabo estos procesos: las células indiferenciadas, las cuales tienen una gran capacidad para diferenciarse en distintos linajes, y las células diferenciadas, que pueden llegar a cambiar su linaje por otro (Rawlins y Hogan, 2006).

Se ha propuesto que existen distintos mecanismos para llevar a cabo la reparación del epitelio, y en tráquea y bronquios de ratones, las células de Clara tienen la función de células regenerativas al poder reemplazar células ciliadas dañadas como consecuencia de una exposición a oxidantes; de la misma manera mencionan que las células epiteliales en injertos de glándulas submucosales pueden regenerar el epitelio laminar en un modelo de ratón (Rawlins y Hogan, 2006).

Es importante enmarcar que muchos tipos de células también participan en el proceso de reparación. Un claro ejemplo se puede observar en bronquiolos, en donde está dado por una clase de células de Clara denominadas variantes (C'), las cuales se encuentran en la unión bronquioalveolar, y proliferan cuando la vía se expone a naftaleno reparando la parte dañada dando lugar tanto a células de su propio linaje (de Clara) como a células ajenas a éste. Cabe mencionar que si todas las células C' se destruyen durante la primera exposición a naftaleno la reparación no se lleva a cabo. Por otro lado tenemos a las células progenitoras bronquioalveolares o BASC's (por sus siglas en inglés), cuya función es similar a la de las C'. Asimismo, las células ciliadas pueden proliferar y transdiferenciarse en células de Clara después de una herida producida por naftaleno. Por su parte, las células de Clara pueden proliferar después de un daño causada por NO₂ (dióxido de nitrógeno) y dar origen a células ciliadas y a las células tipo II, que originan células tipo I después de un daño ocasionado por bleomicina. Finalmente las células neuroendocrinas son capaces de auto regenerarse y proliferar pero no dar origen a otros tipos celulares (Rawlins y Hogan, 2006).

Algunos estudios demuestran que el epitelio tiene un papel fundamental dentro de su propia reparación, y para poder explicar estos cambios repentinos entre los distintos linajes celulares, hace unos años se propuso por primera vez una "Jerarquía clásica de células madre", dentro de la cual tenemos a las células madre indiferenciadas epiteliales, las

amplificadoras transitorias (*Tas* por sus siglas en inglés) de células progenitoras y las células maduras post-mitóticas diferenciadas (Watt y Hogan, 2006), explicada de manera detallada en la *Figura 5*.

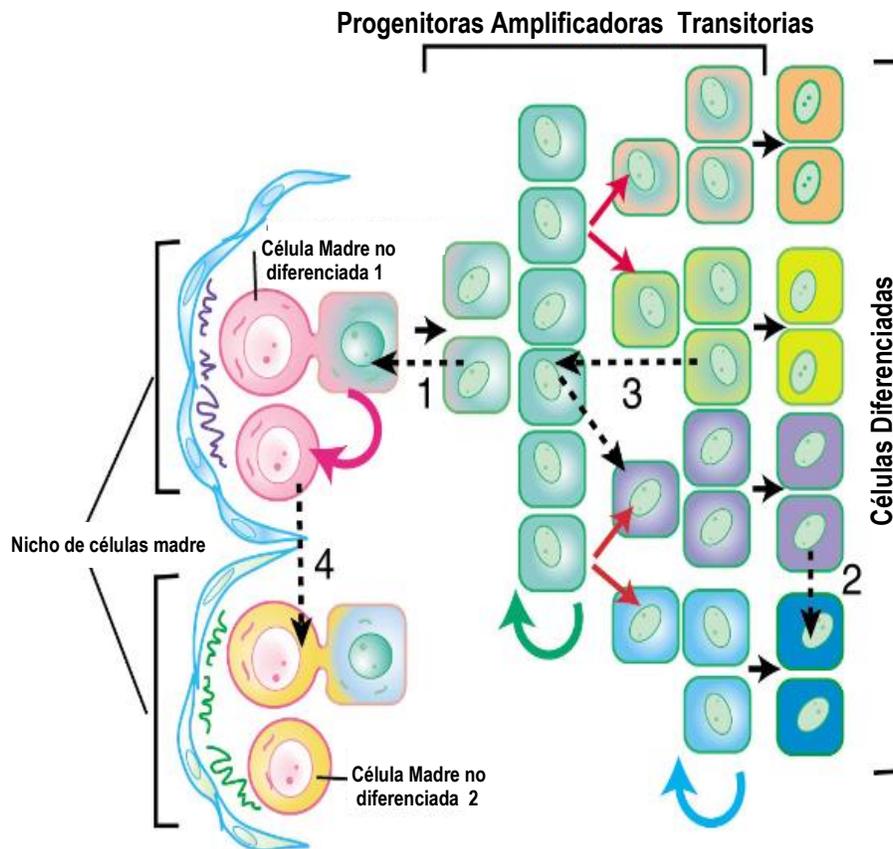


Figura 5. Jerarquía Clásica tentativa en el epitelio de la vía aérea. Los destinos celulares son indicados con las flechas rojas. En este modelo, las células madre se encuentran en su nicho y las diferentes subclases de *Tas* se pueden auto renovar (flechas curvas). Las células madre se renuevan de manera infrecuente, mientras que las *Tas* lo hacen más rápido. Células *Ta* tempranas pueden ser capaces de reemplazar a las células madre mermaadas o agotadas (línea punteada 1). La llamada transdiferenciación de un tipo celular bien diferenciado en otro puede ocurrir de manera directa, sin necesidad de una división celular (línea punteada 2) o puede involucrar la reversión o de-diferenciación entre distintas poblaciones de *Tas* progenitoras (línea punteada 3). Muy raramente las células madre cambian de un linaje específico a otro (línea punteada 4) en un proceso denominado *metaplasia* o *transdeterminación*. Modificado de Watt y Hogan 2006.

La participación del propio epitelio en su reparación es crítica para llevar a cabo la restitución del mismo y recuperar su función normal; sin embargo, el epitelio no es el único que participa en su reparación después de sufrir un daño. Existen otros mecanismos que también participan en dicho proceso de reparación y cuyo papel es fundamental.

1.3. Vías de reparación alternas en la vía aérea.

*La recuperación del epitelio después de un daño es crítica para la restauración de la homeostasis del pulmón. El proceso inicial después de una herida incluye una respuesta inflamatoria aguda, el reclutamiento de células de la inmunidad, el esparcimiento o *spreading*, y la migración celular sobre una matriz provisional que ha sido previamente secretada (Crosby y Waters, 2010).*

Dentro de la respuesta inflamatoria se dan tres eventos sumamente importantes:

- a) **Vasodilatación-** *el tejido dañado induce la liberación de un vasoactivo y factores quimiotácticos que desencadenan un incremento local del flujo sanguíneo y la permeabilidad capilar.*
- b) **Incremento en la permeabilidad capilar-** *este evento facilita la entrada de fluido y células de los capilares hinchados hacia el interior del tejido. El fluido que se acumula tiene un contenido proteico tan elevado que contribuye a que el tejido se inflame ocasionando edema.*
- c) **Entrada de fagocitos-** *estos fagocitos (células de la inmunidad innata capaces de captar microorganismos y restos celulares e introducirlos en su interior con el fin de eliminarlos, en un proceso conocido como fagocitosis) entran al tejido desde los capilares debido a un incremento en la permeabilidad de los mismos. La migración de los fagocitos es un proceso bastante complejo que incluye una adherencia de las células hacia la pared endotelial de los vasos sanguíneos (migración), seguido de su migración hacia el tejido, y finalmente en su migración a través del tejido hacia el sitio de invasión o daño (quimiotaxis). A medida que las células se acumulan y empiezan a fagocitar al causante del daño, liberan enzimas líticas, las cuáles pueden dañar células sanas cercanas.*

A pesar de que el objetivo primordial del proceso inflamatorio es librar al organismo de aquel factor externo que lo lesionó, el daño colateral a las células sanas es algo inevitable y el cuerpo debe de ser capaz de responder también a éste de manera eficaz.

Por otra parte, la herida generada al tejido también provoca la liberación de ciertos factores que contribuyen en los mecanismos de reparación incluyendo a miembros de las familias de los factores de crecimiento epidermal y de fibroblastos como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento de keratinocitos (KGF), y los fibroblastos gingivales humanos (HGF); a las quimiocinas, como por ejemplo la Proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1); a las interleucinas 1 beta, 2, 4, y 13 (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-13); y a las prostaglandinas (PGE₂), entre otros.

Estos factores coordinan procesos que involucran integrinas, proteínas de la matriz (fibronectina, colágeno, laminina), metaloproteasas de matriz como por ejemplo las metaloproteasas de matriz 1, 7, y 9 (MMP-1, MMP-7, MMP-9), adhesiones focales, y cambios en la estructura del citoesqueleto para promover el esparcimiento y la migración celular.

Varias vías de señalización clave son importantes reguladoras de estos procesos, incluyendo la de Sonic hedgehog (Shh), las de Rho Gtpasas, las de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP, por sus siglas en inglés)- como la MAP cinasa- la llevada a cabo por el factor transductor de señal y activador del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), y la Wnt, que son un grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior (Nusse y Varmuse, 2012).

Además de estas vías, tanto células progenitoras distales como localizadas, también son reclutadas hacia el área dañada, y la proliferación y la diferenciación fenotípica de estas células conlleva a una recuperación de la función epitelial; sin embargo, el daño persistente puede contribuir a la patología de ciertas enfermedades tales como las obstructivas crónicas (Crosby y Waters, 2010).

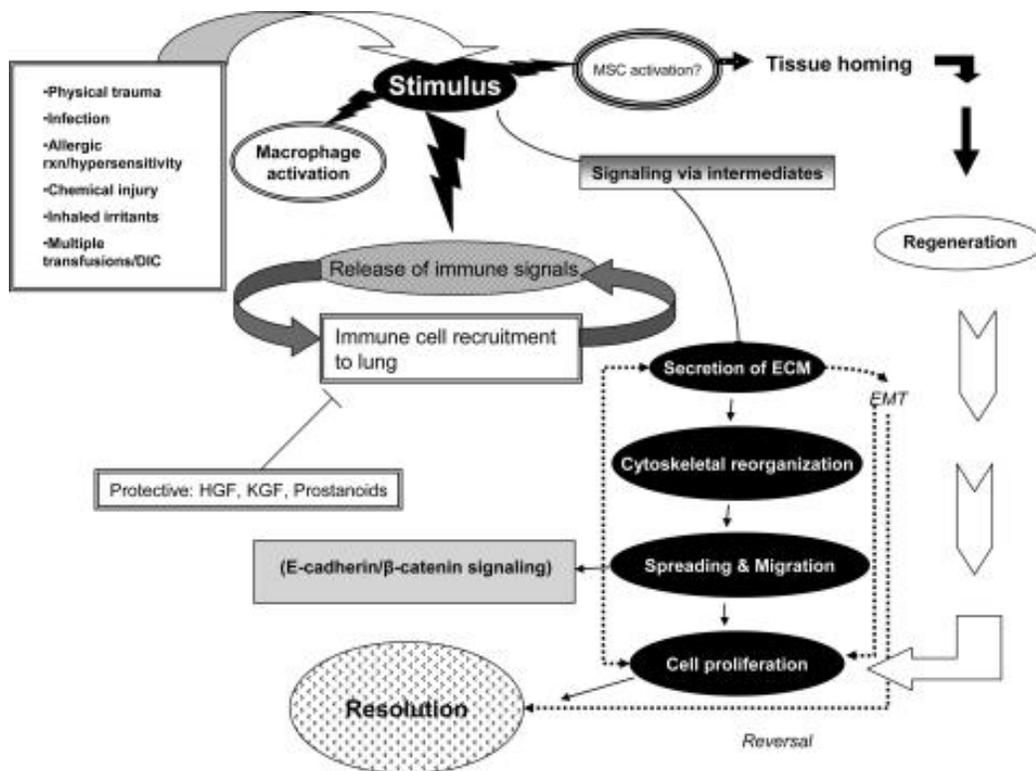


Figura 6. Secuencia de eventos en la reparación epitelial. Después de un daño, macrófagos, neutrófilos, y células madre localizadas se activan, y los factores de crecimiento, citosinas, interleucinas y materiales de la matriz son liberados. Algunos de estos factores reclutan otras células de la inmunidad en el sitio de daño. Células adyacentes al sitio de daño secretan matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) a través de señalizaciones de integrinas y factores de crecimiento, reorganizan su citoesqueleto para facilitar el movimiento, secretan MMPs que degradan aditamentos de la matriz, y se esparcen y migran a lo largo de la matriz provisional previamente secretada utilizando extensiones filopodiales y lamelopodiales. Tanto células progenitoras reclutadas como localizadas proliferan y continúan secretando ECM. La reparación que deja de estar regulada puede desencadenar en una transición mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) y fibrosis. Sin embargo, esto se puede solucionar por medio de un arresto en el ciclo celular, apoptosis, la desaparición de células de la inmunidad, y la desactivación de macrófagos. Tomado de Crosby y Waters, 2010.

Cabe mencionar que los procesos que se dan en la respuesta inflamatoria son iniciados por una serie de eventos complejos que además de involucrar procesos celulares, incluye una variedad de mediadores químicos dentro de los cuáles la histamina es uno de los principales, siendo liberada por algunas células (como por ejemplo los mastocitos) en respuesta al daño tisular.

1.4. Histamina

La histamina o 2-(4-imidazolyl) etilamina (Figura 7), que es una amina biogénica, es formada en el organismo por la descarboxilación de la L-histidina mediante la enzima L-histidinodescarboxilasa, y liberada de mastocitos, basófilos y otras células de la mucosa de las vías aéreas. Existen cuatro subtipos de receptores a histamina: H_1R , H_2R , H_3R y H_4R .

Los cuatro receptores de histamina son proteínas ancladas a membrana que pertenecen a la súper-familia de las GPCRs -por sus siglas en inglés- (Bongers, *et.al.*, 2010).

Como molécula formada durante los procesos de inflamación, está involucrada en las respuestas locales del sistema inmune y juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria no solo ocasionada por algún microorganismo u objeto, sino también por un alérgeno en muchas reacciones alérgicas, dilatando los vasos sanguíneos y haciendo que las paredes de los mismos se vuelvan anormalmente permeables (Marieb, 2001). Por lo tanto, la histamina interviene en las reacciones de hipersensibilidad inmediata y alérgica. Como parte de la respuesta alérgica a un antígeno se generan anticuerpos (IgE), que se unen a la superficie de las células cebadas y los basófilos a través de receptores Fc (Fracción constante) de gran afinidad, que son específicos de la IgE (Prell, 1986).

Es por eso que durante una respuesta exagerada por parte del cuerpo hacia algún alérgeno se administran antihistamínicos, los cuales impiden que ciertas células liberen histamina (como los mastocitos), bloqueando así la reacción alérgica (Bongers, *et.al.*, 2010). Aunado a esto, la histamina también regula la contracción del músculo liso, otras respuestas inmunitarias, la permeabilidad vascular, la neurotransmisión y la estimulación de la secreción del ácido gástrico (Ohtsu, 2010).

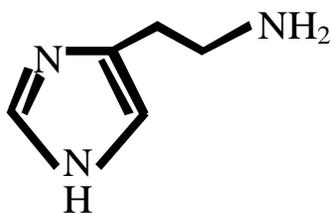


Figura 7. Molécula de histamina.

Con respecto al epitelio de la vía aérea los pocos estudios realizados han sido *in vitro* y han mostrado que la histamina incrementa la permeabilidad epitelial en un modelo de ratón (Kumar *et al.*, 2009), induce hiperplasia en células caliciformes (Hirota *et al.* FASEB J, 2012), además de inducir la producción de H₂O₂ a través de las células epiteliales bronquiales, BECs por sus siglas en inglés (un tipo de células progenitoras de la unión bronquialveolar), generando estrés oxidativo (Rada y Boudreau 2014). Esta evidencia sugiere que esta amina puede ser un factor importante en los procesos de daño epitelial.

1.5. Restitución Epitelial.

Como ya hemos visto, la reparación epitelial involucra el *esparcimiento* y la migración de células vecinas que cubren el área dañada, y esto es seguido por la migración y proliferación de células progenitoras, que restauran los números celulares, y la diferenciación celular, la cual restaura la función (Panos *et al.*, 1996; Rawlins *et al.*, 2007; Yee *et al.*, 2006; Zahm *et al.*, 1997). A los procesos seguidos de la reparación epitelial se les conoce como *restitución epitelial*. En las vías aéreas, las primeras 12-24 h después del daño involucran el *esparcimiento* y la migración como el mecanismo de reparación primario, mientras que la proliferación comienza desde las 15-24 h y continúa por días e incluso semanas (Crosby y Waters, 2010). Esto ha sido demostrado *in vivo* al examinar mecanismos de reparación epitelial a daño en cobayos (Erjefalt *et al.*, 1995; Erjefalt *et al.*, 1995; Km *et al.*, 1997) y en la tráquea de rata (Horiba y Fukuda, 1994). La recuperación de un epitelio pseudoestratificado puede requerir varias semanas (Dupuit *et al.*, 2000).

La reparación *in vivo* del epitelio alveolar ha sido más difícil de examinar, y la mayoría de los estudios se enfocan en la proliferación celular del tipo alveolar II como base de la misma (Thurmond, 2010; Panos *et al.*, 1995). De modo que sabemos considerablemente menos acerca de la reparación epitelial a nivel alveolar. Sin embargo, la progresión del *esparcimiento*, la migración, y la proliferación han sido demostradas utilizando células alveolares tipo II cultivadas (Kheradmand *et al.*, 1994). Aún con esto, uno

de los retos más grandes es el desarrollo de modelos y métodos que nos permitan estudiar los mecanismos de reparación pulmonar, particularmente a nivel alveolar (Crosby y Waters, 2010).

1.6. Sca-1

Para poder dar seguimiento a los procesos de reparación y restitución de células epiteliales se utilizan marcadores celulares. Estos marcadores permiten reconocer el fenotipo celular de los distintos linajes; así, podemos diferenciar entre una célula progenitora de una célula diferenciada, y entre las mismas células diferenciadas. Los marcadores celulares para células progenitoras y madre son bastante conservados sin importar el tejido en el que se estén expresando, y, en algunos casos, nos proporcionan subtipos en las poblaciones de células progenitoras dependiendo de si expresan o no tal o cual marcador. Así pues por ejemplo, tenemos que el marcador CD34^{low}, el cual es una glicoproteína de superficie celular cuya función en las células madre es conferir la adhesión celular a la matriz de la médula ósea o directamente a las células estromales⁴⁰, cuando se expresa con Sca-1⁺ es un marcador para células madre hematopoyéticas (Kazuhiro *et al.*, 2000).

El antígeno de células madre 1 o Sca-1 (*stem cell antigen-1*) es una proteína de 18-kDa de glicosilfosfatidilinositol anclada a la superficie celular (GPI-AP) de la familia de genes *Ly-6*. Originalmente identificado como un antígeno regulado de manera positiva en linfocitos activos, Sca-1 o proteína activadora de linfocitos 6a (*Ly-6a*), se encuentra codificada por dos alelos específicos (Holmes y Stanford, 2007).

Como otras GPI-APs, las proteínas *Ly-6* se encuentran localizadas en una posición ideal desde la cual regulan o co-activan la señalización celular vía receptor-ligando o proteína-proteína. Esto se debe a que la estructura de la superfamilia de *Ly6* se encuentra en balsas lipídicas de la membrana plasmática (Stefanova, *et al.* 1991) que, consistiendo de esfingolípidos saturados y colesterol, juegan papeles críticos en la señalización celular al excluir o concentrar señales moleculares clave así como en la regulación de la degradación y el reciclaje del receptor (Stefanova, *et al.*, 1991); sin

embargo, el mecanismo molecular exacto por medio del cual actúa esta proteína aún no se conoce (Holmes y Stanford, 2007).

1.7. Expresión de Sca-1

La expresión de Sca-1 es regulada de una manera sumamente compleja en la ontología hematopoyética. A medida que las células madre hematopoyéticas o HSCs (por sus siglas en inglés) se diferencian en progenitores mieloídes comunes, la expresión de Sca-1 es regulada de manera negativa (Akashi *et al.*, 2000) volviéndose a regular de manera positiva en la porción del bazo que se encarga de formar colonias celulares también conocido como *colony-forming unit* (CFU). Conforme las HSCs se van comprometiendo en progenitores linfoides, la expresión de Sca-1 decrece (Trevisan e Iscove, 1995) y los protomiocitos que siembran la corteza del timocito regulan de manera positiva la expresión de Sca-1 como (Kondo *et al.*, 1997). Los timocitos inmaduros apagan la expresión de Sca-1 para luego re-expresarla en los timocitos positivos medulares y en las células T periféricas (Spangrude *et al.*, 1989). La expresión de Sca-1 es regulada de manera positiva aún más en linfocitos activados (Bamezai *et al.*, 1995) y en la presencia de interferón- $\alpha/\beta/\gamma$, mientras que el factor de necrosis tumoral- α o el anticuerpo anti-Fas la regulan de manera negativa (Sagi-Assif *et al.*, 1996).

Fuera del sistema hematopoyético, Sca-1 es expresada de manera similar por una mezcla de células madre, progenitoras, y diferenciadas en una gran variedad de órganos. Así, Sca-1 se usa de manera rutinaria en combinación con una selección negativa contra marcadores maduros para el enriquecimiento de células madre (Holmes y Stanford, 2007).

A pesar de que la expresión de Sca-1 ya ha sido descrita en algunos órganos y tejidos, en muchos otros aún no es claro si la expresión de Sca-1 incluye progenitores transitorios de tejidos (Holmes y Stanford, 2007). Uno de esos casos lo encontramos en el pulmón.

1.8. Expresión de Sca-1 en pulmón

Como se ha descrito previamente, el pulmón contiene una gran variedad de poblaciones celulares epiteliales. Modelos de daño han mostrado que existen diversos nichos de poblaciones de células madre en diferentes partes del pulmón y de las vías aéreas (Otto, 2002), cuyo papel en los procesos de reparación y auto-renovación del epitelio son sumamente importantes (Kim et. al, 2005).

En cuanto a la expresión de Sca-1 en pulmón, se sabe que ésta se traslapa con el fenotipo de poblaciones laterales; se ha observado que estas poblaciones pueden ser detectadas por medio de la tinción de Hoechst debido a que tienen propiedades muy similares a las poblaciones celulares conformadas por HSCs.

Cabe mencionar que normalmente se busca asociar Sca-1 con CD45 y CD34 porque, por su parte, CD45 pertenecen a una familia compleja de glicoproteínas de alto peso molecular (180 - 220 kDa) y posee actividad tirosín-fosfatasa jugando un rol importante en la regulación de la diferenciación celular (Pathak et. al., 2005); mientras que CD34 es una glicoproteína de superficie celular que participa en procesos de adhesión de tipo célula-célula; también puede mediar la adhesión de las células madre a la matriz extracelular de la médula ósea, además de que esta proteína se encuentra expresada en tejido hematopoyético temprano (Furness y McNagny, 2006).

Recientemente se han descrito dos poblaciones celulares de Sca-1 en el pulmón: las Sca-1+/CD34- y las Sca-1+/CD34+. En estas subpoblaciones se ha observado que las primeras tienden a comprometerse hacia el epitelio, mientras que las segundas hacia el mesénquima (Hittinger et. al., 2013).

En un estudio en donde se sometió a ratones a bleomicina administrada vía intranasal, no se pudo observar ninguna marca positiva en las células alveolares tipo II, las cuales mostraron tener un fenotipo Sca-1-/CD45-. Es importante mencionar esto porque recordemos que a éstas se les ha adjudicado una actividad progenitora. Sin embargo sí se pudo observar una marca positiva en las células progenitoras bronquio alveolares

(BASCs), pero que resultan negativas a CD45, dando como resultado un fenotipo celular Sca-1+/CD45- (Kim et. al., 2005).

En este mismo estudio se utilizó como marcador adicional a Sca-1 como marcador de células progenitoras debido a que éste se encuentra expresado en la superficie celular, lo cual lo hizo un marcador ideal para llevar a cabo el estudio in vivo, el cual fue realizado en pulmón de ratón. Los otros marcadores utilizados fueron AT2 (marcador específico de neumocitos tipo II) y CCA (un marcador específico de células de Clara). Estas células de pulmón fueron sometidas a una caracterización a través de la metodología de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting, por sus siglas en inglés), y se pudo observar que en condiciones normales, es decir, sin daño alguno, las poblaciones celulares BASCs eran Sca-1+/CD45-. En esta población en particular se pudo observar que el 85% de estas células también eran CCA+ y SP-C+ (surfactant protein C por sus siglas en inglés; detecta neumocitos tipo II); que el 15 % eran células ciliadas también positivas para CCA.

También se ha visto que células bronquio alveolares Sca-1+CD34+CD45-CD31- exhiben, in vitro, una habilidad de multidiferenciación en distintos linajes (Kim, et al, 2005).

1.9. Expresión de Sca-1 asociada con la edad

Hasta el momento no existen muchos estudios sobre posibles cambios en la expresión de Sca-1 en relación con la edad; sin embargo, se ha propuesto que la expresión de Sca-1 podría variar con la misma (Johnson et. al., 1999).

En un estudio realizado en médula ósea de ratón se demostró que con la edad, en ratones deficientes en Sca-1 (Sca-1-/-), la masa ósea exhibe una disminución considerable reflejada en el hecho de que los huesos se vuelven quebradizos; además se pudo observar que tanto in vivo como in vitro, Sca-1 es necesario para llevar a cabo la auto-renovación de progenitores mesenquimales, y la diferenciación de osteoclastos, lo cual permite una renovación normal en la masa ósea (Mortaza et. al., 2002).

Otro estudio realizado en mioblastos de ratón de músculo tibial anterior y músculo sóleo, demostró que la expresión de Sca-1 en éstos es heterogénea, de modo que la mayoría de los mioblastos Sca-1- se dividen de manera

rápida y son capaces de llevar a cabo una diferenciación miogénica para formar miotubos. En contraste, las poblaciones celulares Sca-1+ se dividen más lento, y no forman miotubos. En este estudio se pudo observar que, para este caso en particular, la expresión de Sca-1 es regulada de manera dinámica, y que además ésta depende del microambiente. Un dato interesante es que estudios tanto de ganancia como de pérdida de función demostraron que Sca-1 tiene un papel funcional en la regulación y proliferación de mioblastos. Aunado a esto se pudieron percatar que en los ratones deficientes de Sca-1 el músculo era alterado dependiendo de la edad con un incremento observado en ratones jóvenes y una disminución del mismo en ratones viejos (Mitchell et. al., 2005).

Como se puede apreciar en ambos estudios detectaron cambios en cuanto a la expresión celular únicamente en ratones deficientes de Sca-1, lo cual indica que la expresión de Sca-1 no varía con la edad; sin embargo, hasta este momento, no se encuentra publicado algún estudio en donde relacionen a la histamina o alguna otra molécula de daño con la expresión de Sca-1 a través del tiempo.

2. Justificación

Las vías aéreas son los conductos a través de los cuales se transporta el oxígeno para llevar a cabo la respiración, por lo tanto se encuentran expuestas de manera constante a agentes ambientales que pueden inducir daño, principalmente al epitelio que las recubre. Aunque se sabe que este epitelio es capaz de auto-repararse y así restituir su estructura mediante la participación de células indiferenciadas (madre o progenitoras) y células diferenciadas al ser lesionado por agentes externos, su participación durante la propia respuesta inmunológica del cuerpo en los que se producen inmuno-citocinas y otras moléculas mediadoras de la inflamación, como la histamina, aún no es clara, y menos aun cuando se habla de una posible participación de Sca-1 en el mismo, ya que se sabe que células epiteliales bronquioalveolares Sca-1+CD34+CD45-CD31-, *in vitro*, exhiben una habilidad de multidiferenciación en distintos linajes. Sin embargo, es importante mencionar que el efecto que la edad podría tener en la expresión de Sca-1 aún no se conoce.

Aunado a esto, recientemente se ha visto, en modelos animales, que la inhalación de histamina provoca cambios importantes en la expresión de medidores inflamatorios (Ramos-Ramírez, *et al.*, 2013), por lo cual es muy probable que la histamina provoque cambios en la expresión de Sca-1 también.

3. Hipótesis

La histamina puede alterar la expresión de Sca-1 en las células epiteliales de la vía aérea inferior, principalmente en bronquios y bronquiolos.

4.1. Objetivo general

Determinar la expresión de células Sca-1 en el epitelio de las vías respiratorias de cobayos.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar células positivas Sca-1 en epitelio de cobayos jóvenes y maduros tratados con histamina mediante la técnica de inmunohistoquímica.
- Llevar a cabo conteo de células epiteliales positivas a Sca-1.

5. Metodología

5.1. Animales y pletismografía barométrica.

Se utilizaron cobayos machos raza *HsdPoc:DH* de Harlan México de 350 a 400 g de peso obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Para asegurarnos de que la edad no representaba por sí sola ser un factor determinante para la expresión de Sca-1, se tomaron en cuenta cobayos de edades distintas. Se consideraron como cobayos jóvenes a los animales de 2 meses, y a los maduros de 5 meses.

Una vez definidas las edades, se prosiguió a separar a los cobayos en dos grupos: los controles y los experimentales (sometidos a histamina), tanto de los cobayos jóvenes como de los maduros.

Los cobayos del grupo experimental fueron expuestos a dosis de histamina incrementadas no acumulativas (0 a 0.32 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en aerosol hasta que la respuesta bronco-obstrucciona triplicara el valor iB (índice de broncoobstrucción) basal. Cada dosis de histamina tuvo una duración de 1 min; el intervalo entre las dosis fue de 10 min. La respuesta de la vía aérea a la obstrucción ocasionada por histamina se registró utilizando un pletismógrafo barométrico con una cámara para permitir el libre movimiento de los animales (Buxco Electronics Inc., Troy, NY).

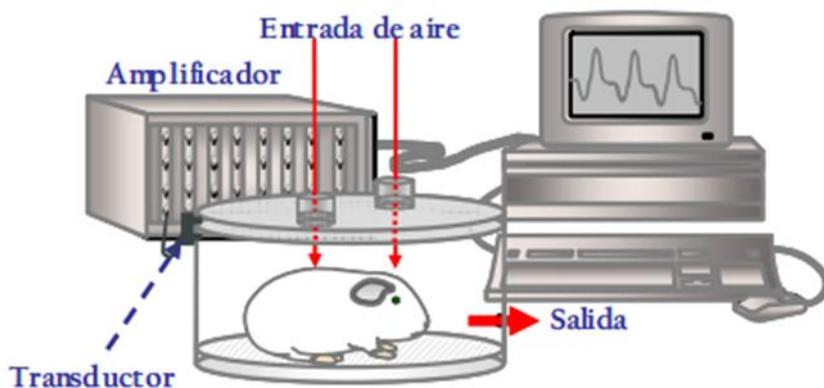


Figura 8. Representación del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara, se utiliza un transductor de presión diferencial que registra dichos cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

El IB se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y el que está dentro del pulmón del cobayo, dado que el aire ambiental entra y se calienta de ~25°C a 37°C una vez que está dentro de los pulmones, además de que también se humidifica al 100%. Los sensores de la cámara de pletismografía detectan este cambio en el volumen como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio, ya que disminuye conforme el cobayo exhala el aire. Debido a que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, durante la exhalación baja el volumen del aire dentro de la cámara y esto se registra como una disminución en la presión. De esta manera, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa de la computadora puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y la expiración en el equipo previamente calibrado (Fig.8.) (Hamelmann et al, 1997). La información es procesada para dar el valor del IB que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$IB = \{(Te - Tr) / Tr\} \{PFE / PFI\}$$

dónde:

Te= tiempo total espiratorio (s)

Tr= tiempo total de relajación (s)

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

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

5.2 Inmunohistoquímica

24 h después de haber sido sometidos a las inhalaciones de histamina, los cobayos fueron eutanasiados recibiendo una inyección de pentobarbital sódico (65 mg/kg). El lóbulo caudal del pulmón derecho de cada grupo de cobayos fue disectado y fijado intra-arterialmente para obtener fragmentos de pulmón, los cuales fueron embebidos en parafina formando bloques.

Para realizar la detección inmunohistoquímica de Sca-1 se realizaron cortes en el laboratorio de Morfología del INER de 3 µm de grosor de los

bloques obtenidos y se colocaron en laminillas silinizadas. Posteriormente los cortes se desparafinaron sometiéndolos a calor en una estufa a 55°C durante 30 minutos y se rehidrataron utilizando alcoholes graduados (en orden de uso: 2 xíloles, 2 alcoholes abtsolutos y 2 alcoholes al 96%). Luego se pusieron dentro de un vaso coupling con buffer de TBS-T por 5 minutos.

La recuperación antigénica se realizó utilizando un buffer de citratos (21.01 g de ácido cítrico en 1000 ml de agua destilada) pH 6 en un microondas potencia 90 por un minuto y medio, y luego 5 minutos con potencia 30. Las laminillas se dejaron enfriar por 30 minutos. Se bloqueó la peroxidasa endógena preincubando los cortes con una solución de H₂O₂ (3%) por 30 min y los sitios no específicos se bloquearon con el suero universal del kit R.T.U. (ready to use) de VectorLabs con sustrato de peroxidasa por alrededor de 10 min; el anticuerpo primario diluido previamente en suero bloqueador del mismo kit se dejó reposar por 24 horas a 4°C. La dilución utilizada fue de 1:100 usando el anticuerpo anti-mouse Sca-1 de R&D Systems. Cabe mencionar que anticuerpo primario solo se le agregó a los controles positivos. A los controles negativos no se les agregó el anticuerpo primario, pero también se sometieron al resto de la metodología descrita a continuación.

La detección de la unión específica se hizo utilizando el anticuerpo secundario universal unido al complejo estreptavidina del kit R.T.U. Finalmente, del mismo kit, se hizo uso de una solución con complejo peroxidasa dado que el revelador utilizado fue Amino-etil-cabazol (VectorLabs), el cual requiere de un sustrato de peroxidasa.

Una vez obtenida la coloración adecuada (15 minutos después de agrgar el revelador), las laminilla se pasaron por agua de la llave para evitar una tinción de fondo o inespecífica y se dejaron incubar por 5 minutos en TBS-T antes de realizar la contratinción, para la cual se usó Hematoxilina de Meyer de VectorLabs.

Para su análisis, todas las laminillas ya procesadas fueron examinadas con un microscopio óptico ZEISS Axio Imager 2 utilizando el programa ZEN de microscopía. Las fotos fueron tomadas con el mismo microscopio.

5.3. Conteo Celular y estadística.

Para el estudio, el conteo celular se hizo en bronquios y bronquiolos de los cuatro grupos. Tanto en los grupos controles como en los grupos experimentales el total de animales por cada grupo fue de 5, exceptuando al grupo control de jóvenes en los cuales solo se pudieron obtener 3 animales. Por lo tanto en dicho grupo el total de bronquios obtenidos fue de 4 y de bronquiolos fue de 3. Para el resto de los grupos (jóvenes con histamina, maduros, y maduros con histamina), se lograron contar aproximadamente 10 bronquios y 10 bronquiolos. Posteriormente, todas las células fueron contadas y diferenciadas dependiendo de si eran positivas o no a la maraca.

El análisis estadístico fue hecho con la prueba de T de Student de una cola y una $p < 0.05$ utilizando el paquete de estadística de Microsoft Excel 2010. Los datos usados para realizar este análisis fueron los porcentajes del número total de células marcadas tenues e intensas y no marcadas.

Para las gráficas de dichos porcentajes, se usaron el error estándar y el promedio, los cuales se introdujeron al programa SlidèWrite. Las barras de las gráficas representan el promedio SE, por sus siglas en inglés, el cual corresponde al error estándar.

6. Resultados

6.1. Reactividad de las vías aéreas

Las curvas dosis-respuesta de histamina no inducen una obstrucción de la vía aérea progresiva, pero sí una respuesta todo o nada a los $0.012+0.002$ mg/ml de histamina ($n=10$) como lo muestra la *Figura 9*.

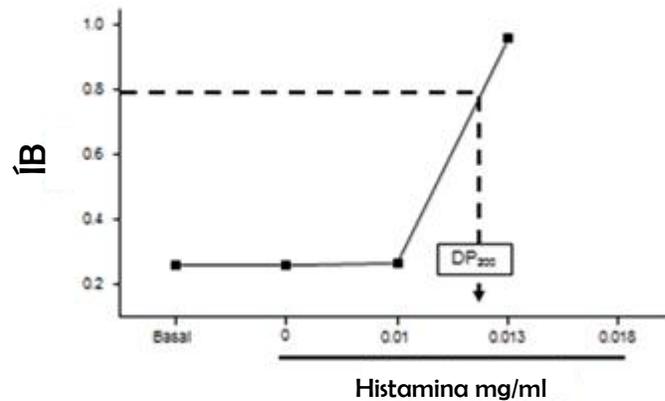


Figura 9. Gráfica representativa de la respuesta a histamina en un cobayo. Después de obtener la línea basal inicial, el cobayo recibió una dosis de histamina no acumulativa. La flecha punteada muestra la dosis provocativa 200% (DP_{200}), i.e., la dosis de histamina interpolada que ocasiona que el ÍB basal se incremente 3 veces.

6.2. Expresión de Sca-1 en el epitelio de las vías aéreas del cobayo

En la *Figura 10* se puede observar que no hay variaciones en la expresión de Sca-1 con respecto a la edad de los cobayos, es decir, jóvenes (2 meses) y maduros (5 meses), en las células de los bronquiolos.

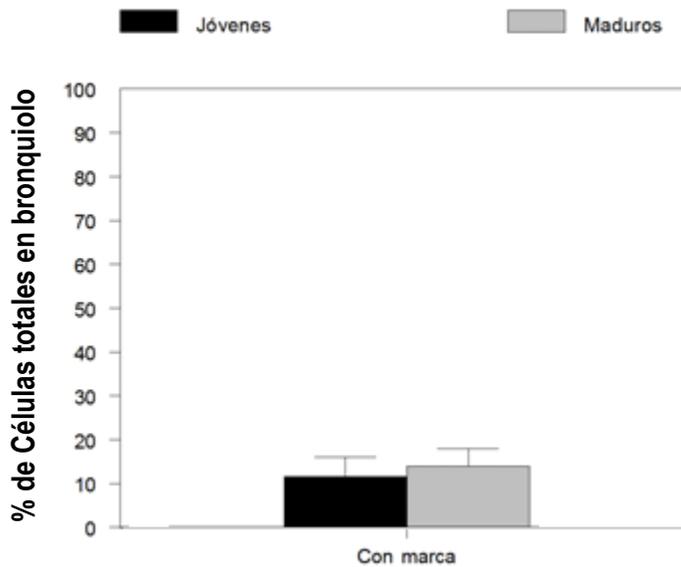


Figura 10. Gráfica comparativa que muestra el total de células epiteliales contadas positivas y negativas a Sca-1 en los bronquiolos por grupo. El grupo joven tuvo una n= 3 mientras que el grupo de los animales maduros una n=5.

En las células epiteliales de los bronquios no se observó diferencia alguna en cuanto a la expresión de esta proteína dada por la edad de los cobayos (Fig.11). Además podemos observar que la cantidad de células sin marca es similar tanto en los cobayos jóvenes como en los maduros.

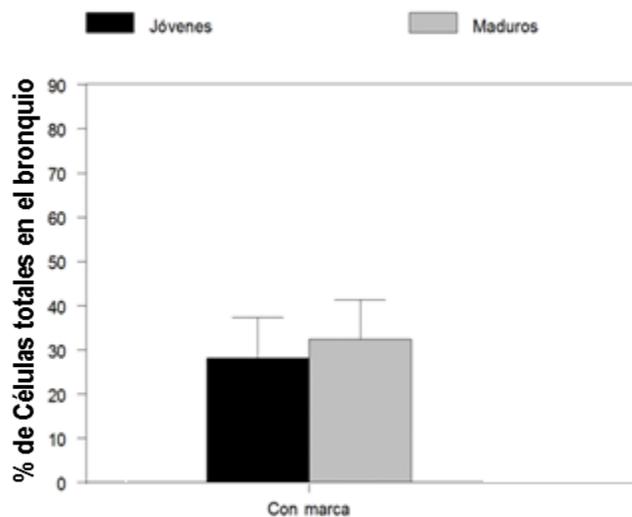


Figura 11. Gráfica comparativa entre el total de células bronquiales contadas por grupo con y sin marca positiva a Sca-1 de los grupos sin histamina.

6.3. Efecto de la histamina en la expresión de Sca-1 en bronquiolos de cobayo

En la *Figura 12* podemos observar un par de bronquiolos de animales jóvenes (2 meses) sometidos a la técnica de inmunohistoquímica. Como se puede observar, el grupo con histamina (experimental) presenta varias células positivas a Sca-1, mientras que el número de células del grupo sin histamina es bastante menor. Cabe mencionar que el músculo liso del grupo experimental presenta una marca positiva a esta proteína.

En la *Figura 13* se puede observar un aumento significativo en las células positivas a Sca-1 ($p < 0.05$) en los bronquiolos de los animales sometidos a histamina.

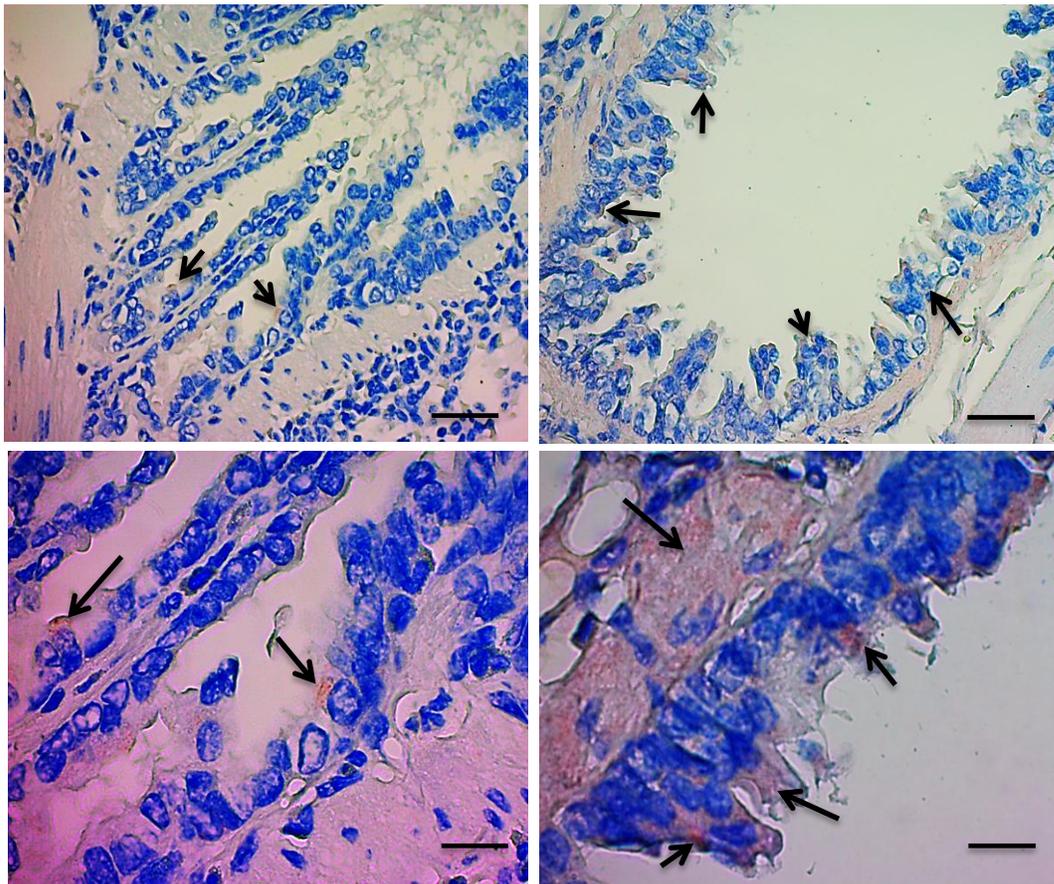


Figura 12. Micrografías que muestran la expresión de Sca-1 en un bronquiolo de un animal control (lado izquierdo) y otro con histamina (lado derecho). Los paneles superiores son acercamientos a 40X (20 μ), mientras que los paneles inferiores a 10 μ . Las flechas negras indican una marca positiva a Sca-1.

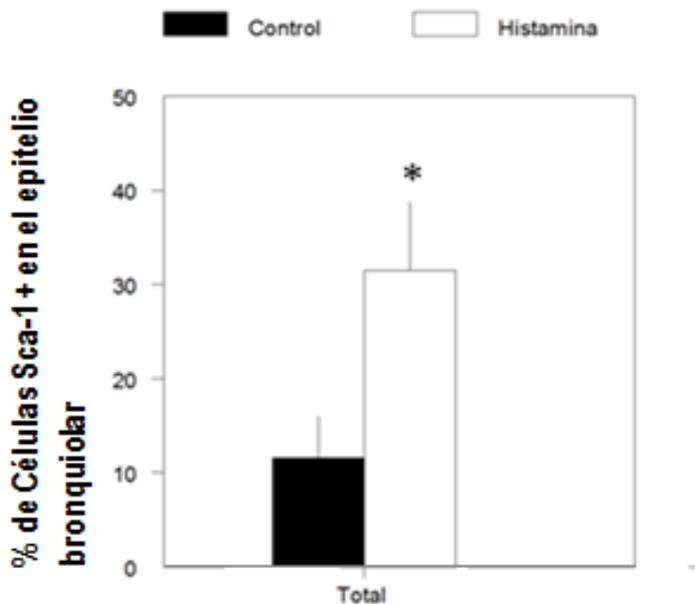


Figura 13. Células contadas para la expresión de Sca-1 en bronquiolos de cobayos jóvenes (2 meses) con y sin reto de histamina. Las barras representan el promedio \pm SE de una $n=3$ para el grupo control, y una $n=5$ para el grupo experimental con una $*p<0.05$ (prueba T de Student no pareada).

En cuanto a los bronquiolos de los animales maduros (5 meses), éstos no mostraron diferencias en la expresión de Sca-1. En la *Figura 14* podemos observar las micrografías de dichos grupos; nótese la intensidad de la marca en un cobayo control (100X) en comparación con uno con histamina. Cabe mencionar que se puede observar un poco de marca en músculo liso en el grupo control.

Como se puede apreciar en la *Figura 15*, no hay ninguna diferencia en la expresión de Sca-1 entre el grupo control y el expuesto a histamina. De hecho se puede decir que ésta es bastante homogénea. Esto indica que para este caso en particular, la histamina no representó un factor determinante para la expresión de esta proteína.

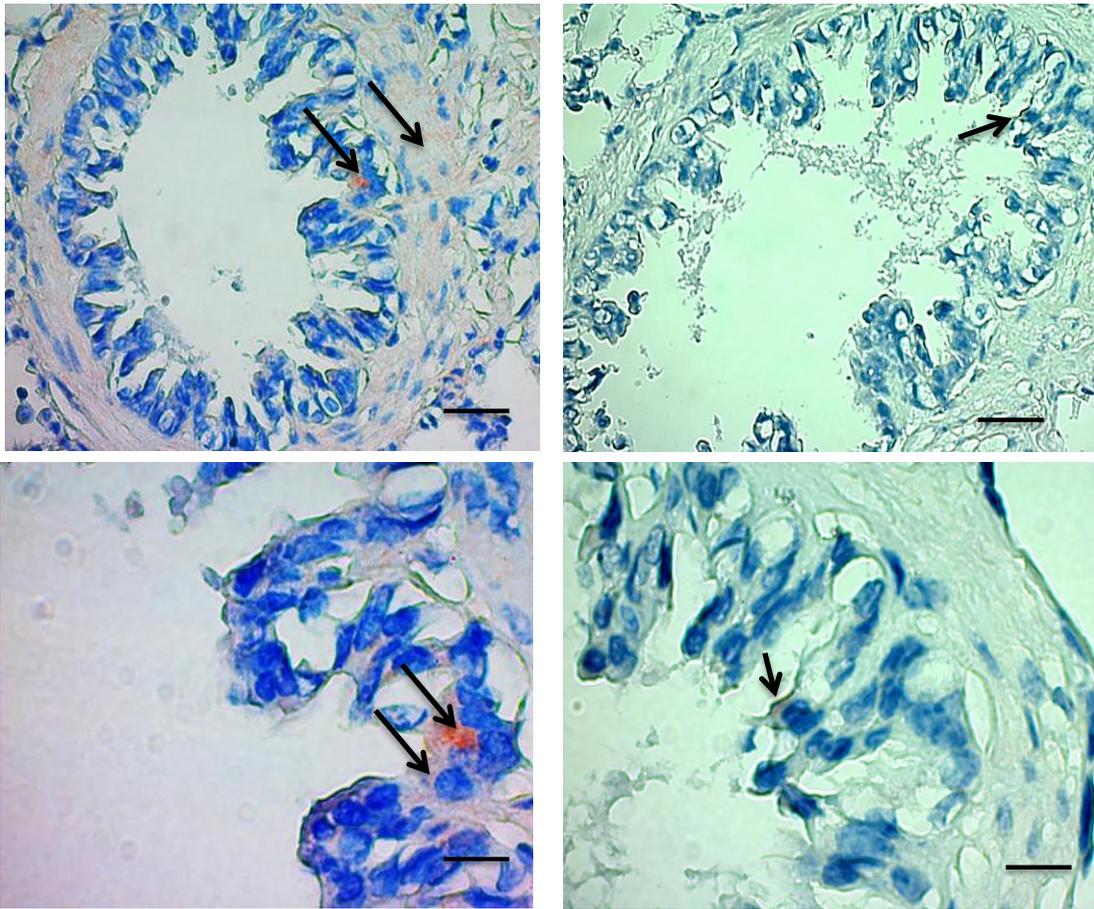


Figura 14. Se presentan cuatro micrografías de dos bronquiolos de cobayos maduros. Del lado izquierdo tenemos al que pertenece al grupo control y del lado derecho y al que pertenece al sometido a histamina. En los paneles de arriba el acercamiento es 40X (20 μ), mientras que en los paneles de abajo es a 10 μ . Las flechas negras indican marca positiva a Sca-1.

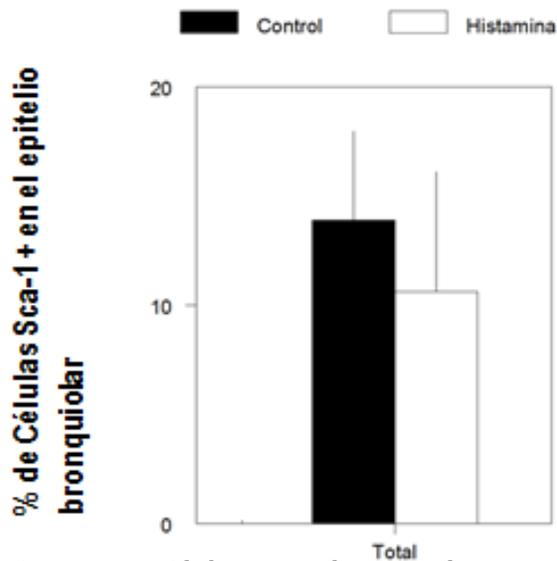


Figura 15. Células contadas para la expresión de Sca-1 en bronquiolos de cobayos maduros (5 meses) con y sin reto de histamina. Las barras representan el promedio \pm SE con una n=5 para ambos grupos.

6.4. Efecto de la histamina en la expresión de Sca-1 en bronquios de cobayo

En cuanto a los bronquios, podemos observar (Figura 16) micrografías de un bronquio de un animal control joven (2 meses) y uno sometido a histamina también joven. Se puede observar de una manera muy clara que la marca de Sca-1 se encuentra prácticamente en todo el epitelio. Cabe destacar que también para ambos grupos tenemos marca en el músculo liso, aunque es más evidente esta marca en el animal con histamina.

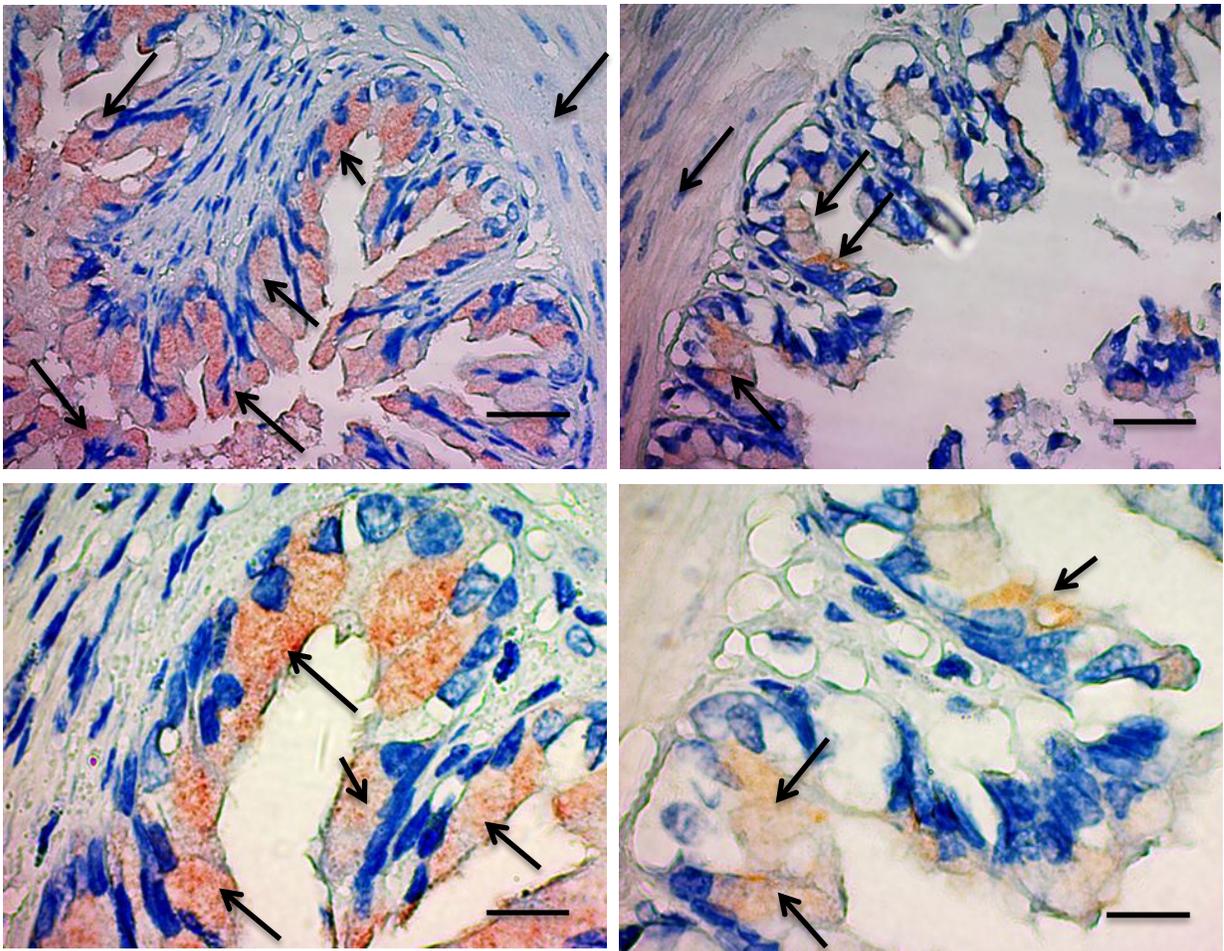


Figura 16. Micrografías de un bronquio de un animal sin histamina (lado izquierdo) y un animal con histamina (lado derecho). En los paneles de arriba el acercamiento es de 40X (20 μ) y en los paneles de abajo es de 100X (10 μ). Las flechas negras denotan la marca positiva para la expresión de Sca-1.

Por su parte, la *Figura 17* muestra que no hay una diferencia en la expresión de Sca-1 entre los animales jóvenes del grupo experimental y los controles. Por lo tanto no hay ni un aumento ni un decremento en su expresión en ninguno de los grupos, más bien podemos observar que es muy similar en ambos casos

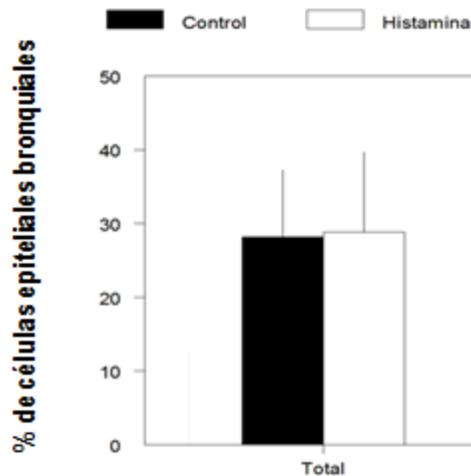


Figura 17. Células contadas para la expresión de Sca-1 en bronquios de cobayos jóvenes con y sin reto de histamina. Las barras representan el promedio \pm SE con una n=5 para ambos grupos.

Por último tenemos a los bronquios de los animales con y sin reto de histamina maduros (5 meses). En la *Figura 18* podemos observar de manera visual una clara diferencia entre ambos grupos. Podemos percatarnos que la marca en el animal del grupo experimental se perdió, mientras que la marca en el animal del grupo control se mantuvo igual de impresionante que su homólogo joven.

En la *Figura 19* nótese que el decremento de células positivas a Sca-1 en el grupo sometido a histamina ($p < 0.05$) es importante.

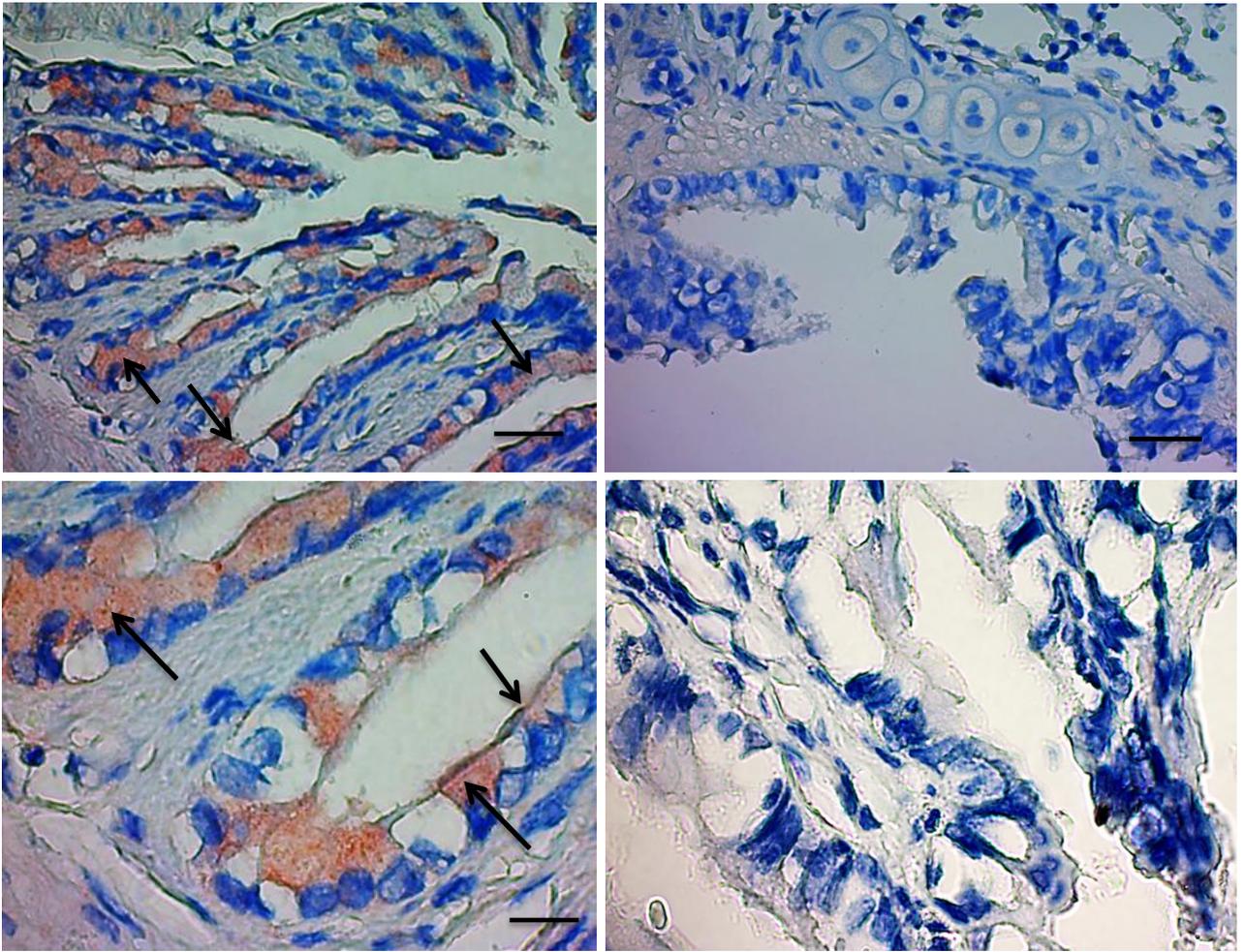


Figura 18. Micrografías de un bronquio de un cobayo maduro del grupo control y un cobayo maduro del grupo sometido a histamina. En los paneles superiores el acercamiento es de 40X (20 μ); en los paneles inferiores de 10 μ . Con flechas negras se indica la expresión positiva de Sca-1.

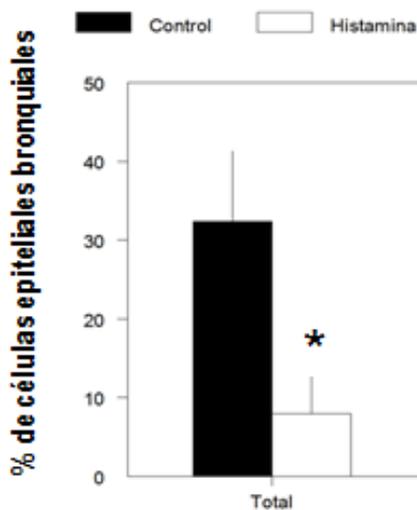


Figura 19. Células contadas para la expresión de Sca-1 en bronquios de cobayos maduros con y sin reto de histamina. Las barras representan el promedio \pm SE de una n=3 para el grupo control y una n=5 para el grupo experimental con una * $p < 0.05$.

7. *Discusión*

Nuestros resultados sugieren que la inhalación de histamina induce cambios en la expresión de Sca-1 en las células epiteliales del cobayo dependiendo de la edad. La histamina tiene un papel importante en la respuesta alérgica en el asma (Ramos-Ramírez et al., 2013); mientras que Sca-1 es un marcador que se encuentra fuertemente asociado a las HSCs del sistema hematopoyético y en general con células madre y progenitoras (Holmes & Stanford, 2007). Este estudio mostró que la histamina induce un incremento en la expresión de Sca-1 en células epiteliales de bronquiolo en cobayos jóvenes, y una disminución de Sca-1 en epitelio bronquial en cobayos maduros.

En nuestro estudio no observamos cambios en la expresión de Sca-1 entre cobayos jóvenes ni maduros, pero sí fue claro que éste marcador se encuentra expresado en una mayor proporción en bronquios (~35%) de las células) que en bronquiolos (~20%). Adicionalmente, en otros tejidos, se ha descrito que la reoblación competitiva se relaciona con la edad. En este sentido, se ha visto que la actividad re-poblacional de las células de la médula de ratones viejos es más alta que aquella de las células de ratones jóvenes (Harrison, 1983). Esto puede ser ocasionado por cambios cualitativos o cuantitativos en HSCs envejecidas en comparación con las HSCs jóvenes. Sin embargo, el mecanismo por medio del cual la actividad de re-población ocurre en células envejecidas de la médula aún se desconoce (Kazuhiro et al., 2000). En este mismo estudio de Kazuhiro y colaboradores (2000) se demostró que el envejecimiento afecta de manera preferente el potencial de diferenciación linfóide de las HSCs pero no afecta ni su diferenciación mielóide ni su potencial para auto-renovarse. Por lo tanto es posible que en el pulmón la expresión de Sca-1 no se vea afectada por la edad, y más bien dependa de otros factores, como por ejemplo, que el tejido se llegue a dañar; además es importante mencionar que en el estudio de Kazuhiro et al. se consideraron a ratones viejos (18 semanas), mientras que para el nuestro los cobayos fueron maduros (5 meses) y no viejos en sí, por lo que esto podría explicar que no se hayan observado cambios en la expresión de Sca-1 en el cobayo.

Un resultado interesante del presente estudio es que las células epiteliales Sca-1+ fueron más abundantes en los bronquiolos de cobayos jóvenes que fueron expuestos a histamina. Aunque no existen estudios en bronquiolos sobre las células Sca-1+, recientemente se describió que los neumocitos tipo II que expresan Sca-1 son fundamentales para inducir la reparación en el epitelio a través de las vías Wnt tras el daño ocasionado por *Pseudomonas aeruginosa* (Yuru et al., 2014). Esto sugiere que la expresión de Sca-1 parece ser fundamental para promover la reparación ocasionado por daño al tejido, y es posible que la histamina sea un inductor de la expresión de Sca-1 en bronquiolos de cobayos jóvenes.

Por otro lado, a diferencia de los cobayos jóvenes, los maduros mostraron una disminución en la expresión de Sca-1 en los bronquios. El incremento o la disminución de Sca-1 en el epitelio puede tener varias implicaciones.

En 2007 Stanford y Holmes propusieron un modelo de cómo es que Sca-1, como molécula co-señalizadora, interactúa en una pool de células progenitoras, como lo podemos ver en la figura 20.

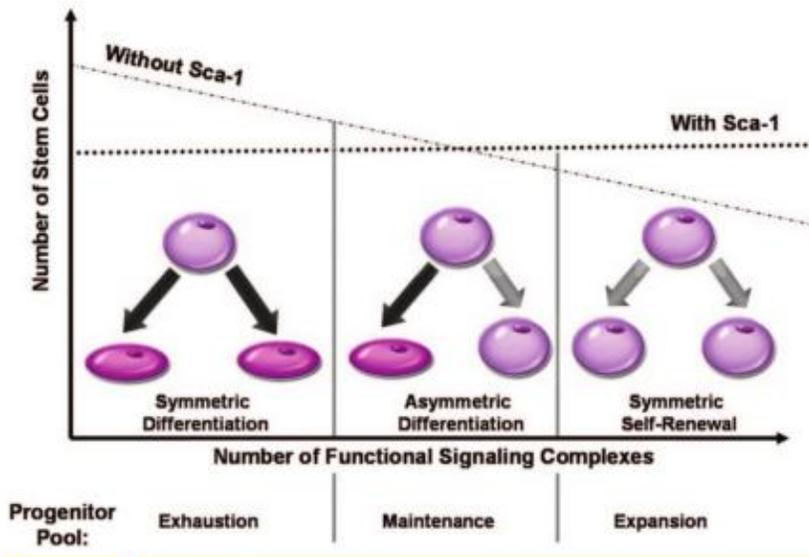


Figura 20. Posible modelo de la interacción Sca-1 en una pool de células progenitoras. Tomado de Stanford y Holmes, 2007.

Básicamente lo que este modelo indica es que en un nicho único y exclusivo de células progenitoras que expresan Sca-1, la cantidad de la misma es importante ya que es capaz de modificar la capacidad señalizadora de un complejo receptor; es decir, si hay una ausencia de Sca-1, las células van a seguir un proceso de diferenciación simétrica que va a terminar agotando

la pool, y por ende ya no habrá más células progenitoras. Nótese que el tipo celular que originan estas células progenitoras son de un linaje celular distinto al suyo. Por otra parte, si Sca-1 está presente, entonces la diferenciación celular será asimétrica, lo cual ocasiona que la población de células progenitoras en el nicho se mantenga. Finalmente, si tenemos una cantidad elevada de Sca-1, aunque la diferenciación celular vuelve a ser simétrica, ahora origina células del mismo tipo o linaje celular, y no solo esto, sino que también es el único escenario en el que se da una auto-renovación celular. Por lo tanto, la población de células progenitoras ya no únicamente se mantendrá, sino que además tendrá un proceso de expansión. Es posible entonces que en el cobayo joven la histamina este promoviendo un incremento de Sca-1 y esto nos lleve a un proceso asimétrico de diferenciación celular en las vías aéreas.

Por su parte, en los animales maduros notamos que la histamina induce una pérdida de la marca en los bronquios. Esto probablemente se deba a que la pool de células progenitoras se fue quedando sin un número funcional de complejos de señalización que involucran a Sca-1 como molécula co-señalizadora llevando una diferenciación celular simétrica y, por lo tanto, a un agotamiento completo de esta pool. A pesar de estos hallazgos, harían falta varios estudios para determinar el papel específico no sólo de Sca-1 en el proceso de reparación y restitución del epitelio pulmonar cuando éste se encuentra expuesto a la histamina, sino también el papel que estas células epiteliales tienen dentro de estos mismos procesos.

*Otro resultado interesante es que parte del músculo liso de las vías aéreas es positivo para Sca-1, por lo tanto, es probable que esta proteína también actúe a nivel de músculo. Un estudio en cardiomiocitos de ratón (Pfister et.al, 2005) demostró que luego de un daño al miocardio, las poblaciones celulares laterales que poseen un fenotipo CD31⁺Sca-1⁺ son las únicas capaces de presentar una diferenciación cardiomiogénica cuya etapa final es un cardiomiocito maduro. El proceso mediante el cual se da la maduración se propone que sea el emparejamiento con cardiomiocitos adultos o *coupling* (Pfister et.al, 2005), aunque esto no ha sido demostrado a nivel de la vía aérea.*

8. Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que la histamina podría alterar a las células responsables de los procesos de reparación. Es probable que la edad del cobayo es un factor importante en la susceptibilidad al efecto de la histamina en las células Sca-1 positivas dependiendo del tejido.

9. Bibliografía.

1. Akashi K, Traver D, Miyamoto T et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to myeloid lineages. *Nature* 2000;404:193-197.
2. Bamezai A, Palliser D, Berezovskaya A et al. Regulated expression of $Ly-6^{a.2}$ is important for Tcell development. *J Immunol* 1995;154:4233-4239.
3. Thurmond R.L. *Histamine in Inflammation.* (2010). Bongers G, de Esch I, y Leurs R. Capítulo 2: *Molecular Pharmacology of the Four Histamine Receptors.* Landes Bioscience and Springer Media.
4. Brunton L, Lazo J, & Goodman P. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11º Edición. Edición Mc Graw Grill
5. The CIBA Collection of Medical Illustrations. Vol. 7: Respiratory System. Ed. D.B. Mathew. P.p. 25-27.
6. Crosby L. M. y Waters C.M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Jun 2010; 298(6): L715-L731.
7. Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, Mongodin E, de Bentzmann S, Copreni E, Puchelle E. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L165-L176, 2000.
8. Erjefalt JS, Erjefalt I, Sundler F, Persson CG. Effects of topical budesonide on epithelial restitution in vivo in guinea pig trachea. *Thorax* 50: 785-792, 1995.
9. Erjefalt JS, Erjefalt I, Sundler F, Persson CG. In vivo restitution of airway epithelium. *Cell Tissue Res* 281: 305-316, 1995.

10. Furness SG, McNagny K (2006). "Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis". *Immunol. Res.* 34 (1): 13-32.
11. George R.B., Light R. W., Mathy M.A., Mathy R. A. (2005). *Chest Medicine: Essentials of Pulmonary and critical Care Medicine*. 5^a edición. Editorial: Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia.
12. Hirota *et al.* Histamine may induce airway remodeling through release of epidermal growth factor receptor ligands from bronchial epithelial cells. *FASEBJ.* 26, 1704-1716 (2012)
13. Holmes C & Stanford L. W. Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function, and Enigma. *Stem Cells* 2007; 25:1339-1347.
14. Horiba K, Fukuda Y. Synchronous appearance of fibronectin, integrin alpha 5 beta 1, vinculin and actin in epithelial cells and fibroblasts during rat tracheal wound healing. *Virchows Arch* 425: 425-434, 1994.
15. Citation: Hittinger M, Czyz ZT, Huesemann Y, Maneck M, Botteron C, et al. (2013). Molecular Profiling of Single Sca-1+/CD34+ Cells—The Putative Murine Lung Stem Cells. *PLoS ONE* 8(12): e83917. doi:10.1371/journal.pone.0083917.
16. Kazuhiro S *et. al.* Age Associated Characteristics of Murine Hematopoietic Stem Cells. *The Rockefeller Press JEM* vol. 192 no.9. 2000: 1273-1280.
17. Kheradmand F, Folkesson HG, Shum L, Derynk R, Pytela R, Matthay M.A. Transforming growth factor-enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 267: L728-L738, 1994.
18. Kim *et. al.* Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung CancerCell. Volume 121, Issue 6, 17 June 2005, Pages 823-835.

19. Kim JS, McKinnis VS, Adams K, White SR. Proliferation and repair of guinea pig tracheal epithelium after neuropeptide depletion and injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L1235-L1241, 1997.

20. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and in cancer. *Cell* 2005; 121:823-835.

21. Kondo M, Weissman II, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672.

22. Kumar P, et. al. *Expert Rev Mol Med*. 2009. 11:e19.

23. Marieb, E. (2001). Human anatomy & physiology. San Francisco: Benjamín Cummings, 414. ISBN 0-8053-4989-8. RUBIO, C. et al. Anafilaxia (en español). *Anales Sis San Navarra [online]*. 2003, vol.26, suppl.2 [citado 2010-01-13], pp. 103-110. ISSN 1137-6627.

24. Mortaza B, et.al. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly6A null mice. *PNAS*. 2003. Vol 100. Pp 5840-5845.

25. Nusse, Roel; Varmus, Harold (2012). Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO Journal* 31 (12): pp. 2670-2684.

26. Thurmond R.L. Histamine in Inflammation. (2010). Ohtsu H. Capítulo 3: Histamine Synthesis and Lessons Learned from Histidine Decarboxylase Deficient Mice. Landes Bioscience and Springer Media.

27. Panos RJ, Bak PM, Simonet WS, Rubin JS, Smith LJ. Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest* 96: 2026-2033, 1995.
28. Panos RJ, Patel R, y Bak PM. Intratracheal administration of hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates rat alveolar type II cell proliferation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 574-581, 1996.
29. Pfister O *et. al.* CD31 but not CD31⁺ Cardiac SPC exhibit Functional Cardiomyocytes. *Circulation Research.* 2005; 97: 52-61
30. Prell G.D. & Green J. P.; 1986. Histamine as a neuroregulator. *Annu Rev. Neurosci.* 9, 209-254.
31. Rada B, Boudreau HE, Park JJ, Leto TL. *Am J Respir Cell Biol*, 2014. 50:125-34.
32. Radivoj V. Krstic.(1997) Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology. Springer-Verlag. 3^a edición. Lausanne, Suiza. P.p. 142-145.
33. Ramos-Ramírez P, Campos G. M, García-Zepeda E, Martínez-Cordero E & Bazán-Perkins M.B. *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 01/2014; 71:83-87.
34. Rawlins L.E. y Hogan L. M. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities of many? *Development*, 133. Pp. 2455-2465.
35. Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 410-417, 2007
36. Rogers K.(2011). The Respiratory System. Nueva York: Britanica Educational Publishing.

37. Sagi-Assif O, Traister A, Katz BZ et al. IFN α and anti-Fas antibodies regulate Ly-6E.1 expression in tumor cells: A possible link between angiogenesis and Ly-6E.1. *immunol Lett* 1996;54:207-2013.
38. Spangrude GJ, Klein J, Heimfeld S et al. Two monoclonal antibodies identify thymic-repopulating cells in mouse bone marrow. *J Immunol* 1989;142:425-430.
39. Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ et al. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 1991; 254: 1016-1019.
40. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 5: 328-333, 2008.
41. Sulabha Pathak, U. Palan. *Immunology Essential and Fundamental.* Ed: Science Publisher, India (2005), 2.^a. Ed. Pp. 125.
42. Trevisan M & Iscove NN. Phenotypic analysis of murine long-term hematopoietic reconstituting cells quantitated competitively in vivo in comparison with more advanced colony-forming progeny. *J Exp Med* 1995: 181:93-103.
43. Webster's New World. Medical Dictionary.(2008). 3^a edición. Wiley Publishing. WebMd.
44. Yee M, Vitiello PF, Roper JM, Staversky RJ, Wright TW, McGrath-Morrow SA, Maniscalco WM, Finkelstein JN, O'Reilly MA. Type II epithelial cells are critical target for hyperoxia-mediated impairment of postnatal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L1101-L1111, 2006.
45. Zahm JM, Kaplan H, Herard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskel* 37: 33-43, 1997.

46. *Zahm JM, Pierrot D, Chevillard M, Puchelle E. Dynamics of cell movement during the wound repair of human surface respiratory epithelium. Biorheology 29: 459-465, 1992.*
47. *<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/bronchi>. Consultado: 18/06/2014. 2:36 p.m.*
48. *<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=947>. Consultado: 01/08/2014. 7:54 p.m.*
49. *<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh333/219-228.htm>. Consultado: 18/06/2014. 1:54 p.m.*