



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de cavinas en un modelo de asma
alérgica en cobayo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SANDRA LUZ SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. Mayra Dinorah Álvarez Santos
Cd. Universitaria, D. F. 2015**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a la vida por darme la oportunidad de estar aquí para cerrar un nuevo ciclo y seguir persiguiendo mis metas.

A mi padre por ser un ejemplo de trabajo duro y constancia, por inspirarme siempre a buscar la excelencia y por brindarme su amor y su apoyo incondicional cuando más lo he necesitado.

A mi madre por haber dedicado su vida a enseñarme lo esencial para vivirla.

A Dulce y a Mariana por ser mis mejores amigas, mis compañeras, mis cómplices. Porque nadie en el mundo me entiende como ellas. Porque me acompañan en las buenas y en las malas y porque sin su amor y su compañía no podría haber sobrevivido hasta ahora.

A Daniel por darme su amor y comprensión. Por tener siempre las palabras correctas para inspirarme cuando estuve a punto de flaquear y por estar siempre a mi lado.

A Mayra por ser mi mentora, por haberme formado en el trabajo de laboratorio y haberme enseñado todo lo necesario para realizar esta tesis; pero sobre todo por tener la fortuna de llamarla amiga.

A Blanca Bazán por iniciarme en el quéhacer científico, por sus palabras de aliento y su guía durante todo este proceso.

A Marianita, Jessica, Karina, Abán, Marina, Vera, Rubí y Picazo. Haberme convertido en bióloga no hubiera sido tan divertido y bello sin ustedes.

A Karilili, Óscar, Ed, Aldo, Mau, Janny, Gaby y Nancy. Por existir en mi vida.

A mis amigos del INER por haber hecho la experiencia de realizar esta tesis mucho más enriquecedora y divertida.

A los miembros del jurado por ayudarme a mejorar este trabajo y prepararme para terminar esta etapa de la mejor manera.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	- 3 -
ÍNDICE DE FIGURAS	- 7 -
ABREVIATURAS	- 8 -
RESUMEN	- 10 -
INTRODUCCIÓN	- 13 -
VÍAS AÉREAS	- 13 -
ASMA	- 20 -
FISIOPATOLOGÍA DEL ASMA ALÉRGICA	- 22 -
OBSTRUCCIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS	- 24 -
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS	- 24 -
MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS	- 25 -
CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO	- 27 -
CAVEOLAS	- 28 -
CAVEOLINAS	- 29 -
CAVINAS	- 31 -
CAVEOLAS Y EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS	- 32 -
JUSTIFICACIÓN	- 35 -
HIPÓTESIS	- 35 -
OBJETIVO GENERAL	- 35 -
OBJETIVOS PARTICULARES	- 35 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 37 -
ANIMALES	- 37 -
SENSIBILIZACIÓN	- 37 -
PLETISMOGRAFÍA	- 38 -
REACTIVIDAD DE LA VÍA AÉREA	- 41 -
EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	- 42 -
WESTERN BLOT	- 42 -
INMUNOHISTOQUÍMICA	- 44 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 45 -
RESULTADOS	- 46 -
REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS	- 46 -

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE CAV-1.....	- 47 -
LOCALIZACIÓN DE CAV-1, EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.....	- 51 -
.....	- 51 -
.....	- 52 -
.....	- 52 -
DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE CAVINAS.....	- 53 -
LOCALIZACIÓN DE CAVINAS EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS	- 59 -
.....	- 64 -
.....	- 64 -
.....	- 65 -
LOCALIZACIÓN DE CAV-1 Y CAVINAS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR EN EL PULMÓN....	- 66 -
DISCUSIÓN.....	- 68 -
CONCLUSIONES.....	- 79 -
REFERENCIAS.....	- 80 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de las vías aéreas humanas	- 15 -
Figura 2 Diferencias regionales en los tipos celulares del epitelio de las vías aéreas	- 19 -
Figura 3 Modelo de la cubierta caveolar.	- 29 -
Figura 4 Equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento.....	- 39 -
Figura 5 Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica.	- 40 -
Figura 6 Reactividad de las vías aéreas a la histamina en el modelo de asma alérgica en cobayo.	- 46 -
Figura 7 Determinación de la expresión de Cav-1 en miocitos traqueales de cobayo	- 50 -
Figura 8 Localización de Cav-1 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo.....	- 52 -
Figura 9 Determinación de la expresión de Cavina-1 en el músculo liso traqueal de cobayo.....	- 54 -
Figura 10 Determinación de la expresión de Cavina-2 en el músculo liso traqueal de cobayo.....	- 56 -
Figura 11 Determinación de la expresión de Cavina-3 en el músculo liso traqueal de cobayo.....	- 58 -
Figura 12 Localización de Cavina-1 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo.	- 60 -
Figura 13 Localización de Cavina-2 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo....	- 62 -
.....	- 64 -
Figura 15 Control negativo (blanco) de las IHQ realizadas en cortes de pulmón de cobayo.....	- 65 -
Figura 16 Distribución de Cav-1 y cavinas (-1,-2 y -3) en el músculo liso vascular de pulmón de cobayo.	- 67 -

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Ca ²⁺	Ion calcio
Cav-1	Caveolina-1
Cav-2	Caveolina-2
Cav-3	Caveolina-3
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fcε	Fracción constante ε
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ÍB	Índice de Broncoobstrucción
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
ISAAC	Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Niñez.
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PI ₃	Fosfoinositol
Th ₂	Linfocito T cooperador 2
Th ₁₇	Linfocito T cooperador 17

TNF- α

Factor de Necrosis Tumoral α

SSF

Solución Salina Fisiológica

RESUMEN

El asma bronquial es una enfermedad que afecta principalmente las vías aéreas inferiores, las cuales comprenden tráquea, bronquios y bronquiolos. Las tres características que definen este tipo de asma son la hiperreactividad de las vías aéreas, la inflamación y la obstrucción, siendo la hiperreactividad la anomalía funcional que caracteriza a la enfermedad. La hiperreactividad de las vías aéreas se distingue porque el músculo liso presenta una mayor sensibilidad ante los estímulos contráctiles. Para que el músculo liso lleve a cabo el proceso de contracción es necesaria la participación funcional y estructural de las denominadas caveolas. Las caveolas son invaginaciones de membrana que se encuentran constituidas principalmente por dos familias de proteínas, las caveolinas y las cavinas. Estudios previos han revelado que en el modelo de asma en cobayos los niveles de expresión de Caveolina-1(Cav-1) se incrementan en los miocitos traqueales, en contraste, el papel de posibles alteraciones en la expresión de cavinas en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas, no se conoce. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de Cav-1 y de Cavina-1, -2 y -3 en un modelo de asma alérgica en cobayo. Se utilizaron cobayos machos raza HsdPoc:DH que fueron sensibilizados y retados con ovoalbúmina (OVA). El grupo control recibió solución salina fisiológica (SSF) en lugar de OVA. Durante los retos antigénicos con OVA se registró la actividad respiratoria y se determinó el grado de obstrucción de las vías aéreas mediante pletismografía barométrica. En el tercer reto antigénico se evaluó la

hiperreactividad de las vías aéreas y 24 horas después del último reto los cobayos se sacrificaron por eutanasia y se obtuvieron las muestras de tráquea y del lóbulo pulmonar inferior izquierdo. Por medio de inmunohistoquímica (IHQ) y de Western Blot se evaluó la expresión de Cav-1 y Cavina-1, -2 y -3 con anticuerpos específicos. El análisis de los resultados de este estudio muestra que todos los cobayos del modelo de asma desarrollaron hiperreactividad de las vías aéreas. La determinación de la expresión mediante la intensidad relativa de las bandas mostró que la expresión de Cav-1 total no presenta un cambio estadísticamente significativo en el músculo liso traqueal de cobayos del modelo de asma, pero que la expresión de las isoformas de Cav-1 (α y β) no está variando de la misma manera entre ellas, ya que la isoforma α presenta mayor intensidad en el modelo mientras que la β es básicamente igual en el modelo de asma y en el control. Por otro lado, la expresión de Cavina-1, -2 y 3 muestra un cambio estadísticamente significativo; en los tres casos la expresión en el músculo liso traqueal incrementó en el modelo de asma y algo similar se observó en el músculo liso de bronquios y bronquiolos evaluado por medio de IHQ. En los cortes de pulmón el epitelio muestra una señal positiva muy evidente. También se evaluó la expresión de cavinas en el músculo liso de las estructuras vasculares del pulmón y lo que se encontró fue que la señal positiva de Cavina-1, -2 y -3 en las IHQ se aprecian más fuertes en el modelo de asma comparado con el control, contrario a lo que ocurre con la expresión de Cav-1 que se observa disminuida en el modelo de asma. Lo descrito previamente sugiere que el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas puede estar

relacionado con una expresión alterada de los constituyentes de las caveolas en el músculo liso traqueal, como es el caso de las cavininas y Cav-1.

INTRODUCCIÓN

VÍAS AÉREAS

Las vías aéreas son las encargadas de suministrar al cuerpo el oxígeno que las células necesitan para obtener energía y realizar sus funciones normales. A este proceso se le conoce como respiración celular. Para que se lleve a cabo dicho proceso el oxígeno debe pasar desde las vías aéreas hacia el torrente sanguíneo y de ahí a todos los tejidos (Gartner & Hiatt, 2002; Moore & Dalley, 2002; Roa, Bermúdez, & Acero, 2000; Welsch, 2008). Las vías aéreas son estructuras de conducción del aire que lo preparan para que llegue en condiciones óptimas al interior, es decir, se encargan de humedecerlo y entibiáarlo, además de atrapar partículas ambientales (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008).

Las vías aéreas tienen una estructura típica en la pared y presentan ciertos cambios estructurales y de tipos celulares conforme se desciende a lo largo de la vía, estas modificaciones morfológicas están relacionadas con las exigencias fisiológicas específicas de cada región (Constanzo, 2000; Gartner & Hiatt, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). Se observa que recubriendo la superficie que da a la luz de las vías aéreas hay una mucosa que consta de epitelio y lámina propia. El epitelio característico de las vías aéreas (epitelio respiratorio) es cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes y células basales, mientras que la lámina propia está constituida de tejido conectivo. El tejido conectivo está compuesto por células como fibroblastos que se encargan de producir una abundante cantidad de matriz extracelular así como las fibras características de

este tipo de tejido. Sus funciones son el soporte estructural, depósito de grasa y principalmente proporciona un medio de intercambio de sustancias con otros tejidos como el epitelial (Gartner & Hiatt, 2002). El de la lámina propia es de proporciones variables y suele alojar varias glándulas seromucosas (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008).

Por debajo del tejido conectivo que forma la lámina propia se encuentra una nueva capa de tejido conectivo y de sostén, y una de tejido muscular. La capa de tejido de sostén varía según el nivel de las vías aéreas; en la región de la cabeza es tejido óseo mientras que en el cuello y dentro de los pulmones es tejido cartilaginoso (Welsch, 2008). El músculo se encuentra en estrecha relación con el cartílago a través de tendones elásticos y se trata de músculo liso excepto al nivel de la faringe y laringe en donde cambia por músculo estriado (Moore & Dalley, 2002). En cualquier caso una de las características más notables del tejido conectivo de las vías aéreas es la abundancia de fibras elásticas (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008).

Las vías aéreas se dividen en superiores e inferiores (Moore & Dalley, 2002). Las primeras agrupan a la cavidad nasal, los senos paranasales, la faringe y la laringe (Gartner & Hiatt, 2002; Moore & Dalley, 2002; Welsch, 2008), mientras que las vías aéreas inferiores inician inmediatamente después de la laringe (Figura 1) conformándose por la tráquea bronquios y bronquiolos que se dividen dicotómicamente (Moore & Dalley, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008).

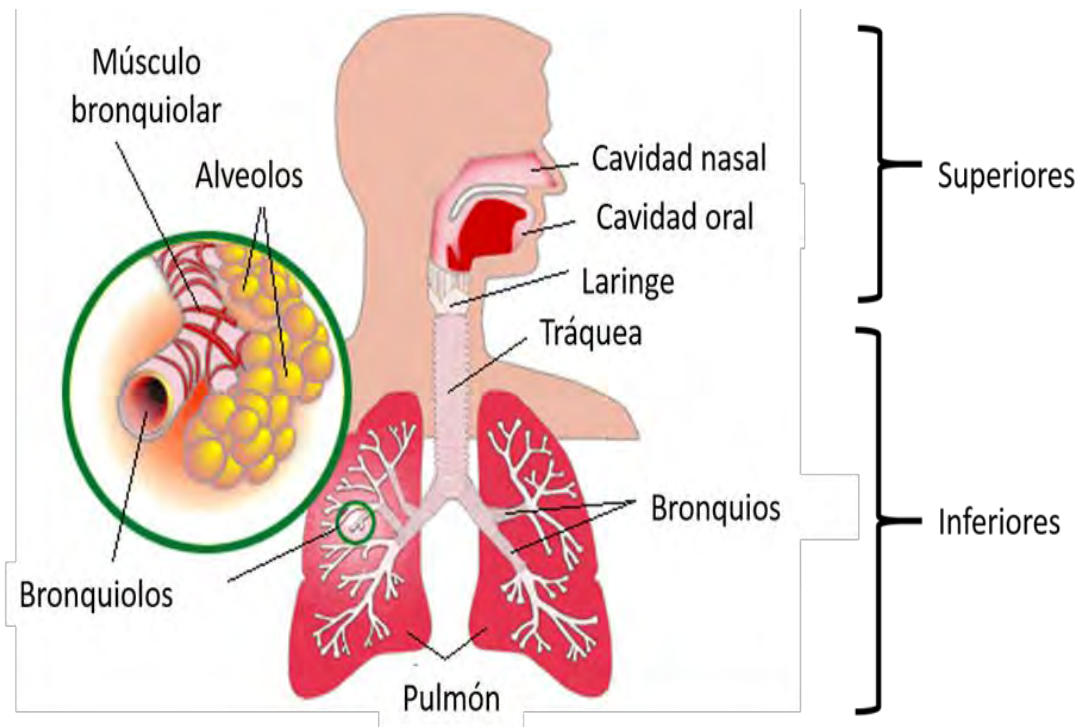


Figura 1. **Esquema de las vías aéreas humanas.** Modificado de http://www.medicinenet.com/smokers_lung_pathology_photo_essay/article.htm

El epitelio de las vías aéreas inferiores es en las partes más altas de esta región un epitelio respiratorio ciliado pseudoestratificado en el que se pueden ir observando ciertos cambios en su composición celular mientras se va adentrando en la vía aérea (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008).

La tráquea es un tubo de aproximadamente 12 cm de largo y 1.5 cm de ancho en el humano adulto. La pared traqueal tiene un epitelio respiratorio ciliado pseudoestratificado con células caliciformes y células basales. Puede presentar unas células en cepillo (con microvellosidades) que se presume son sensoriales (Gartner & Hiatt, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). Ocasionalmente, se pueden observar linfocitos y otros leucocitos en el epitelio (Abbas, Lichtman, &

Pober, 2002; Welsch, 2008). El epitelio se sostiene sobre su lámina propia y posee abundantes glándulas seromucosas (Gartner & Hiatt, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). Debajo de la mucosa existe una capa conocida como fibromusculocartilaginosa (Welsch, 2008). Ventralmente esta capa está formada por una serie de anillos cartilaginosos incompletos; el cartílago es hialino y los anillos se cierran dorsalmente por músculo liso que corre de forma transversal y ocasionalmente longitudinal. Los anillos cartilaginosos están separados unos de otros por un tejido conectivo denso y fibroso con muchas fibras elásticas (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008), estos se denominan ligamentos anulares.

Una característica importante en la fisiología de la tráquea y de las vías aéreas es la producción de moco como mecanismo para limpiar los conductos de las partículas ambientales provenientes del aire (Constanzo, 2000; Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Por ello a lo largo de la tráquea y los bronquios se localizan abundantes glándulas productoras de moco, que junto al producto de las células caliciformes y los cinocilios del epitelio respiratorio forman el aparato mucociliar (de Zubiría C., 2004; McPhee, Lingappa, & Ganong, 2003; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). Este mecanismo se encarga de arrastrar las partículas potencialmente dañinas hacia la faringe donde pueden ser deglutidas o expectoradas. Los cinocilios baten de 12 a 20 veces por segundo en la tráquea y aproximadamente 25 veces en los bronquios, siempre en dirección oral, lo que hace que el aparato mucociliar se comporte como un banda transportadora (Welsch, 2008).

La tráquea da origen a dos bronquios los cuales a su vez continúan dividiéndose dicotómicamente para dar origen a los bronquios lobares, bronquios segmentarios y posteriormente a los bronquios subsegmentarios o bronquios pequeños (Moore & Dalley, 2002; Roa *et al.*, 2000).

La pared de los bronquios es muy semejante en estructura a la pared traqueal pero algunos tipos celulares se observan disminuidos como las células caliciformes, mientras que se empieza a observar la presencia de otros como las células de clara (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). El epitelio de la mucosa bronquial presenta las características células ciliadas del epitelio respiratorio, pero también presenta gran cantidad de células basales, capaces de reemplazar a las otras células epiteliales. Estas células representan el 30 % de las células epiteliales bronquiales (Welsch, 2008). Las glándulas seromucosas son tan abundantes en esta región que se pueden encontrar incluso por fuera de las placas de cartílago que rodean al músculo liso subyacente a la mucosa (Welsch, 2008). Este nivel constituido por el músculo liso, el cartílago y las glándulas se conoce como capa fibromusculocartilaginosa. El cartílago de esta capa se encuentra en forma de placas irregulares principalmente de cartílago hialino, aunque en las porciones más distales hay cartílago elástico, predominando en los bronquios más pequeños (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Por último, las capas de tejido conectivo se rodean de un tejido conectivo laxo muy innervado y vascularizado (Gartner & Hiatt, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008).

El tejido linfático es un componente muy importante de los bronquios, en donde se le conoce como BALT (del inglés Bronchial Associated Lymphatic

Tissue) (Abbas *et al.*, 2002; Gartner & Hiatt, 2002; Murphy, Travers, Walport, & Janeway, 2009; Welsch, 2008). Se puede encontrar en forma de nódulos linfáticos aislados o en pequeños grupos, pero también se observan células individuales como linfocitos, especialmente T y células plasmáticas. Se observan campos con linfocitos T entre los nódulos donde también hay vénulas de endotelio alto (Welsch, 2008).

La última parte de las vías aéreas está representada por los bronquiolos, éstos tienen un diámetro de entre 1 - 0.4 mm y forman la duodécima a duodécimaquinta generación del árbol de las vías aéreas (McPhee *et al.*, 2003; Moore & Dalley, 2002; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). A este nivel ya no hay cartílago ni glándulas, también son infrecuentes las células caliciformes (Welsch, 2008). En el epitelio, que va de cilíndrico pseudoestratificado a cilíndrico simple, predominan las células ciliadas y las células de clara (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Las células de clara se caracterizan por ser cilíndricas, abovedadas, sin cilios; en los seres humanos contienen gránulos de secreción de un producto glucoprotéico antiadhesivo que puede ayudar al flujo del aire a través de bronquiolos estrechos y que podrían tener funciones como producción de sustancia tensoactiva o como precursoras de otras células bronquiolares (Welsch, 2008).

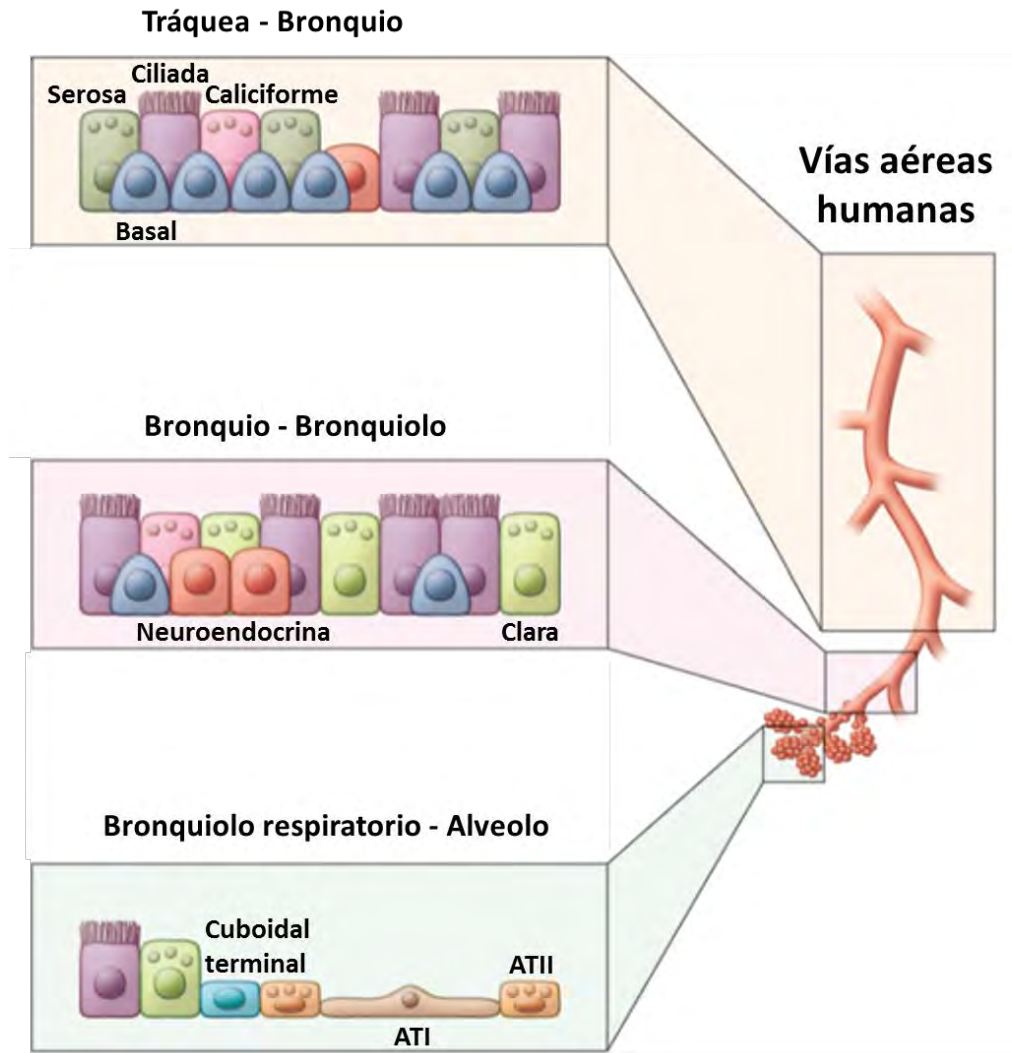


Figura 2 *Diferencias regionales en los tipos celulares del epitelio de las vías aéreas.* A nivel de la tráquea y las primeras ramificaciones de los bronquios se pueden observar células ciliadas, serosas, caliciformes y basales. Éstas últimas se encargan de reponer otros tipos celulares. Conforme los bronquios se ramifican y se llega a los bronquiolos las células caliciformes disminuyen su número hasta desaparecer en los bronquiolos. En este nivel aparecen las células de clara y células neuroendocrinas. Las últimas ramificaciones de los bronquiolos conocidos como bronquiolos respiratorios se caracterizan por presentar un epitelio cuboidal simple que se transforma en plano cuando se entra en los compartimientos alveolares. En los alveolos se observa principalmente células alveolares tipo I (ATI) y tipo II (ATII). Modificado de Rackley & Stripp, 2012.

Como ya se había mencionado, existen mecanismos inherentes a la fisiología de las vías aéreas que participan en la defensa del tracto respiratorio (Constanzo, 2000; McPhee et al., 2003; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). El aparato mucociliar es uno de ellos (Constanzo, 2000; de Zubiría C., 2004; McPhee

et al., 2003; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008), pero también se incluyen los reflejos de la tos y la broncoobstrucción, así como la producción de secreciones como IgA, lisozimas y lactoferrina además de la respuesta inmune celular (Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). Cuando estos mecanismos se encuentran mal regulados o exacerbados pueden propiciar el desarrollo de condiciones patológicas como ocurre en el caso del asma (McPhee *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2000).

ASMA

El asma es una enfermedad que afecta a nivel mundial aproximadamente a 300 millones de individuos. Resulta problemático conseguir estadísticas comparables sobre la prevalencia del asma, ya que se trata de una enfermedad heterogénea. A pesar de esto, se calcula que a nivel global el asma tiene una prevalencia que varía entre el 1 % y el 18 % en diferentes regiones del mundo (GINA, 2011). Los resultados de estudios basados en el método del Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Niñez (ISAAC por sus siglas en inglés) demuestran que la prevalencia de la enfermedad en México es variable, en un rango de aproximadamente 5 % en la ciudad de México a un 12 % en ciudades como Mérida (Vargas B., 2009a). En cualquiera de los casos el asma se considera dentro de las primeras 10 causas del uso del servicio de salud, principalmente urgencias y consulta externa (INER, 2010) representando pérdidas económicas importantes y una disminución de la calidad de vida del paciente.

El asma se puede agrupar dentro de las enfermedades pulmonares denominadas obstructivas, cuya contraparte son las enfermedades intersticiales

(McPhee *et al.*, 2003). Las enfermedades obstructivas como la EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica), las bronquiectasias o el asma misma, se caracterizan por una oclusión de las vías aéreas que impide que el aire inspirado salga normalmente durante la espiración. Las manifestaciones clínicas clásicas del asma son tos generalmente seca, dificultad respiratoria y sibilancias (Roa *et al.*, 2000).

El asma se define como una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas en la cual se observan diversos cambios a nivel estructural y funcional, que conllevan al desarrollo de hiperreactividad inespecífica del músculo liso y obstrucción variable de las vías aéreas (Blume & Davies, 2013). Las primeras definiciones consideraban al asma como un padecimiento único del músculo liso debido a la eficacia de los broncodilatadores como opción terapéutica (Holgate, 2010), sin embargo, la inflamación es una de las características principales en el desarrollo de la enfermedad, apareciendo muchas veces antes que los síntomas clásicos de asma (de Zubiría C., 2004; Holgate, 2010).

Uno de los problemas más importantes para el estudio, diagnóstico y la terapéutica del asma es la heterogeneidad de la enfermedad, ya que dentro de los factores que desencadenan las crisis asmáticas se encuentran varios agentes ambientales, además de la susceptibilidad genética propia del individuo (Kim, DeKruyff, & Umetsu, 2010; Rojas R., 2004). Esta combinación de factores ambientales y genéticos, propicia el desarrollo de diferentes fenotipos y formas de asma, dentro de las que se pueden mencionar el asma alérgica (extrínseca), el asma no alérgica (intrínseca), el asma de tipo severa con resistencia a esteroides,

el asma inducida por sensibilidad a la aspirina, el asma relacionada con el ejercicio, el asma relacionada con la obesidad y el asma inducida por la exposición a la contaminación, al humo de cigarro o a las partículas de diésel (Kim *et al.*, 2010). Todos estos factores condicionan una respuesta fisiopatológica particular que se ve reflejada a la hora de reaccionar ante un tratamiento específico. De todas estas formas de la enfermedad el asma alérgica ha sido el foco principal de estudio al ser un tipo muy común de asma (Kim *et al.*, 2010).

FISIOPATOLOGÍA DEL ASMA ALÉRGICA

El asma alérgica atraviesa varias fases que determinan el curso de la historia natural de la enfermedad, y en su desarrollo están involucradas células del sistema inmune y células estructurales de las vías aéreas.

La fase inicial o de sensibilización al alérgeno consiste en que éste sea presentado por una CPA (Célula presentadora de antígeno) a un linfocito T virgen (de Zubiría S., 2004a; Holgate, 2010). Este linfocito virgen se diferencia en un linfocito T cooperador 2 (Th₂) por la influencia de IL-4. Una vez diferenciado, este linfocito Th₂ secreta otras citocinas como IL-5, IL-9, IL-13 e IL-4 (de Zubiría S., 2004a; McPhee *et al.*, 2003). Estas citocinas promueven la diferenciación de células B a células plasmáticas secretoras de IgE específica para el alérgeno que viajan por la sangre hasta las vías aéreas. Esta inmunoglobulina interacciona con los receptores Fcε de las células cebadas y basófilos que están presentes por la influencia de las citocinas Th₂ (Abbas *et al.*, 2002; de Zubiría S., 2004a; Holgate, 2010; Murphy *et al.*, 2009). Tras esta sensibilización, cuando el individuo es

reexpuesto al alérgeno presenta una rápida broncoobstrucción en respuesta a la degranulación de células cebadas previamente sensibilizadas por la IgE específica para el alérgeno (Barnes, 1996; de Zúbiría C., 2004; McPhee *et al.*, 2003). Los mediadores liberados por las células cebadas interactúan con el músculo liso de las vías aéreas que presentan una mayor sensibilidad ante estos estímulos (músculo hiperreactivo) (de Zúbiría S., 2004b; McPhee *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2000; Wright, Sharma, *et al.*, 2013).

El mecanismo descrito previamente se conoce como fase temprana del asma (de Zúbiría C., 2004; Holgate, 2010; McPhee *et al.*, 2003) y ocurre minutos después de la exposición al alérgeno, sin embargo los mediadores liberados durante la fase temprana como prostaglandinas, leucotrienos y las citocinas Th₂, sirven como señales para el reclutamiento de células inflamatorias como eosinófilos y otros linfocitos Th como los Th₁₇. Estas células reclutadas liberan otro tipo de mediadores que llevan al desarrollo de una respuesta inflamatoria tardía, que se desarrolla horas después (de Zúbiría C., 2004; Roa *et al.*, 2000). A los mediadores iniciales se les suman otros mediadores producidos por las nuevas células (eosinófilos, linfocitos Th₁₇) como el TNF- α , IL-4, IL-13 y quimiocinas que a su vez también son producidas por las células estructurales (de Zúbiría S., 2004a, 2004b; McPhee *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2000). La inflamación de las vías aéreas se acompaña con hipersecreción de moco y edema que también son consecuencia de la liberación de mediadores (Barnes, 1996; de Zúbiría C., 2004; Holgate, 2010; McPhee *et al.*, 2003; Moore & Dalley, 2002; Roa *et al.*, 2000).

La inflamación, la obstrucción variable y la hiperreactividad de las vías aéreas es el resultado de la interacción entre elementos celulares como citocinas y quimiocinas así como de elementos tisulares.

OBSTRUCCIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS

La obstrucción de las vías aéreas se presenta por diferentes alteraciones en la fisiología de las mismas (McPhee *et al.*, 2003; Moore & Dalley, 2002; Roa *et al.*, 2000). La contracción exacerbada del músculo liso, la hipersecreción de moco y el engrosamiento de la pared traqueobronquial debido a la inflamación y edema, son eventos que pudieran estar ocasionando la obstrucción del paso del aire que caracteriza al proceso asmático (de Zubiría C., 2004; Moore & Dalley, 2002; Vargas B., 2009b).

HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

La hiperreactividad de las vías aéreas se caracteriza por ser la alteración fisiológica más importante del asma. Aunque no es una característica única del asma, sí permite diferenciar al asma de otras enfermedades obstructivas (Wright, Sharma, *et al.*, 2013). El grado de relajación o contracción del músculo liso determina en gran parte el calibre de las vías aéreas y al mismo tiempo la resistencia que éstas oponen al flujo del aire. Las vías aéreas hiperreactivas se distinguen por presentar una mayor sensibilidad hacia diferentes estímulos contráctiles del músculo liso, lo que condiciona que la resistencia hacia el flujo del aire también aumente (Wright, Sharma, *et al.*, 2013) contribuyendo a la

obstrucción. La sensibilidad a los estímulos contráctiles tiene su origen en alteraciones de la fisiología muscular normal, como cambios en el flujo de Ca^{2+} , alteración de los canales operados por receptor o por modificaciones de las proteínas del aparato contráctil (Constanzo, 2000; Siddiqui et al., 2013; Wright, Trian, et al., 2013). El músculo liso no solo contribuye al desarrollo del asma por medio de su contractilidad en respuesta a estímulos exógenos, también es un productor importante de mediadores inmunomoduladores, por lo que también está participando en el mantenimiento de la inflamación (de Zubiría C., 2004; Wright, Sharma, et al., 2013; Wright, Trian, et al., 2013; Xia et al., 2013).

MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

La capacidad de contracción es una característica común a casi todas las células, pero son las células musculares o miocitos las que están diseñadas anatómicamente y funcionalmente, especialmente para cumplir la función de contracción (Welsch, 2008). El tejido muscular que forman estas células puede ser de tres tipos, músculo esquelético que tiene a su cargo la locomoción, músculo cardíaco que se encarga del latido del corazón y el músculo liso que se encuentra en la pared de las vísceras huecas y como células mioepiteliales en las glándulas (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008).

Las células del músculo liso reciben este nombre porque a diferencia del músculo esquelético y cardíaco no presentan estriaciones visibles (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Esto se debe a que los filamentos del aparato contráctil muscular liso no se ordenan de la manera en que lo hacen los otros tipos

musculares. Los filamentos de actina (4-8 nm de diámetro) y los filamentos de miosina tipo II (15 nm de diámetro) se disponen de manera oblicua dentro de la célula sin que se observen límites nítidos (de Zubiría C., 2004; Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Se asocian de 13 a 14 filamentos de actina en uno de miosina (Welsch, 2008). Los filamentos de actina terminan en una densidad citoplásmica conocida como cuerpo denso equivalente a una línea Z en una miofibrilla (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). En la periferia los filamentos se anclan en placas de adhesión compuestas por vinculina y talina unidas por integrinas a la membrana celular. Además filamentos intermedios de desmina o vimentina (en el músculo liso vascular) forman una red de soporte en el citoplasma (Welsch, 2008).

El músculo liso se encuentra principalmente innervado por el sistema nervioso autónomo pero muchos factores influyen en la actividad contráctil de las células como noradrenalina, acetilcolina, NO, estrógenos, oxitocina, histamina o serotonina (Constanzo, 2000; Welsch, 2008). En las vías aéreas, el músculo liso de tráquea y bronquios está innervado por fibras simpáticas y parasimpáticas que dilatan y estrechan las vías aéreas respectivamente (Gartner & Hiatt, 2002; Moore & Dalley, 2002; Welsch, 2008). La adrenalina circulante también interactúa con los receptores β_2 del músculo bronquial dilatando la luz de las vías aéreas igual que la innervación simpática (Constanzo, 2000; McPhee *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2000; Welsch, 2008). En la pared de los bronquiolos, el músculo liso forma una red laxa de haces gruesos, frecuentemente en disposición helicoidal (Welsch, 2008) como

se puede observar en la Figura 1. Esta red se distiende durante la inspiración y se contrae ligeramente durante la espiración.

En el asma el aparato contráctil del músculo liso presenta alteraciones en su fisiología que ocasionan una contracción exacerbada, relacionada ampliamente con la hiperreactividad y el estrechamiento de las vías aéreas (Hirota, Nguyen, Schaafsma, Sharma, & Tran, 2009).

CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

La contracción de la célula muscular lisa depende del aumento de Ca^{2+} en el citosol, que puede provenir del espacio extracelular o del retículo sarcoplásmico (Constanzo, 2000; de Zubiría C., 2004; Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008). Los filamentos se asocian con tropomiosina y los de actina con caldesmona. El Ca^{2+} que entra a la célula se une a la calmodulina que puede entonces unirse a la caldesmona provocando la separación de actina de la tropomiosina (Gartner & Hiatt, 2002; Welsch, 2008; Wright, Tripathi, *et al.*, 2013). Esto pone en marcha el deslizamiento de los filamentos de forma no organizada dentro de la célula. Además el contacto de la calmodulina- Ca^{2+} activa a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina que la prepara para el establecimiento del contacto con el Ca^{2+} (de Zubiría C., 2004; Welsch, 2008).

Además de las cisternas del retículo sarcoplásmico que almacenan el calcio dentro de la célula, otras estructuras importantes para la transducción de señales y la contracción del músculo liso de las vías aéreas son unas invaginaciones de

membrana conocidas como caveolas (Maniatis, Chernaya, Shinin, & Minshall, 2012; Welsch, 2008).

CAVEOLAS

Las caveolas fueron descritas desde la década de los años 50's (Cohen, Hnasko, Schubert, & Lisanti, 2004; B Razani & Lisanti, 2002; Babak Razani, Woodman, & Lisanti, 2002), sin embargo su participación en la fisiología celular no ha podido ser descrita de forma completa en la actualidad. Las caveolas son invaginaciones de membrana en forma de matraz de aproximadamente 50-100nm de diámetro (Briand, Dugail, & Le Lay, 2011; Chen, Wu, Chou, Lang, & Wang, 2011; Babak Razani *et al.*, 2002) que se pueden encontrar en forma individual o formando unas estructuras en forma de roseta separadas de la membrana (Cohen *et al.*, 2004; Babak Razani *et al.*, 2002).

A diferencia de las vesículas cubiertas de clatrina, las caveolas tienen una superficie de apariencia lisa (Cohen *et al.*, 2004). De modo muy similar a las balsas lipídicas, las caveolas son ricas en colesterol y esfingolípidos lo que les confiere cierta rigidez (Cohen *et al.*, 2004; Gosens *et al.*, 2011; B Razani & Lisanti, 2002; Babak Razani *et al.*, 2002).

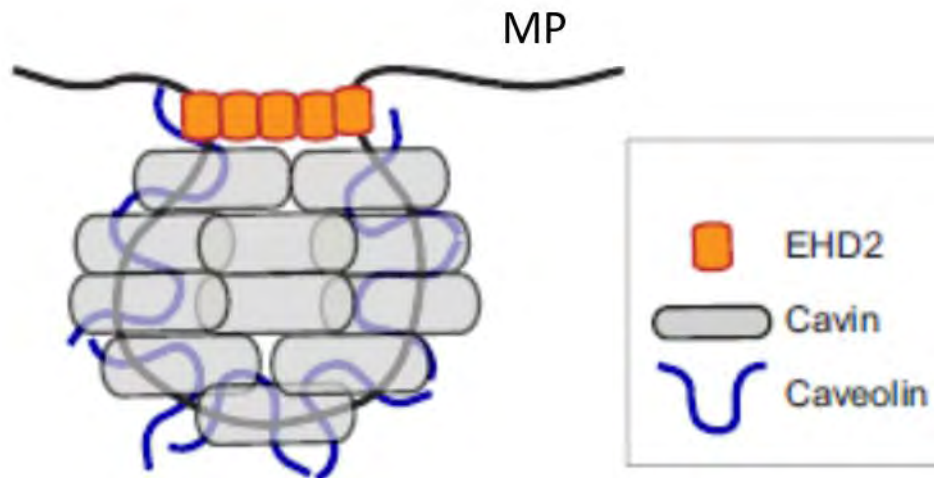


Figura 3 Modelo de la cubierta caveolar. Las cavinas son proteínas periféricas que recubre la superficie de la caveola mientras que las caveolinas se encuentran embebidas en la membrana plasmática. La proteína EHD2 se localiza en el cuello de las caveolas y parece estar regulando la dinámica de las caveolas. Modificado de Kovtun, Tillu, Ariotti, Parton, & Collins, 2015

Las caveolas están recubiertas por proteínas que se asocian a los lípidos de la membrana (dominios lipoprotéicos) que reciben el nombre de caveolinas (Gosens *et al.*, 2007; Maniatis *et al.*, 2012; Prakash & Thompson, 2007). Estos dominios lipoprotéicos forman sitios en la membrana capaces de secuestrar receptores, canales iónicos e incluso efectores de señalización (Gosens *et al.*, 2007) de modo tal que quedan expuestos para su participación en distintas funciones celulares como la endocitosis, la proliferación celular, la migración o la contracción muscular.

CAVEOLINAS

Las caveolinas son proteínas que constituyen la cubierta de las caveolas insertándose en la membrana plasmática asociadas a los lípidos de la misma. La

presencia de estas proteínas en la membrana permite diferenciar a las caveolas de otros dominios lipoprotéicos como lo son las balsas lipídicas, con las que comparten ciertas propiedades bioquímicas (Babak Razani *et al.*, 2002). Se trata de proteínas acetiladas de un tamaño que varía entre los 22 y 24 kDa; se encuentran insertadas en la membrana celular con ambas terminaciones, amino y carboxilo, del lado citosólico de la célula (Hansen & Nichols, 2010).

En la actualidad se conocen tres integrantes de la familia de genes de las caveolinas: Cav-1, Cav-2 y Cav-3. Cav-1 fue la primera en ser descubierta y es también conocida como VIP-21 por sus siglas en inglés (Vesicular integral protein of 21 kDa) (Hansen & Nichols, 2010; Babak Razani *et al.*, 2002). Presenta dos isoformas, una denominada α (de migración lenta) y otra denominada β (de migración rápida) que es 3 kDa más ligera que la primera. Esta proteína se expresa en prácticamente todos los tejidos no musculares y en el músculo liso y se encuentra interactuando ampliamente con otro miembro de la familia, Cav-2 (Hansen & Nichols, 2010) con quien forma heterodímeros y quien tiene una distribución en tejidos muy similar (Zhu, Cui, Chang, & Fang, 2010). Cav-2 presenta una isoforma conocida como -2α y otras dos variantes truncas conocidas como -2β y -2γ con distribución subcelular distinta a la -2α . Cav-3 tiene una distribución más limitada que Cav-1 y -2 y ha sido estudiada principalmente en músculo liso vascular, cardíaco y esquelético, células gliales y mioepiteliales de las glándulas mamarias (Gupta, Toufaily, & Annabi, 2014)

En un principio, la investigación sobre caveolas se centraba en las caveolinas como únicas proteínas estructurales de estas especializaciones de

membrana, sin embargo, análisis posteriores arrojaron que existe otra familia de proteínas que participa en la biogénesis de las caveolas: las Cavininas (Briand *et al.*, 2011).

CAVINAS

Las cavininas están conformadas por una familia de 4 proteínas (Cavina-1 a Cavina-4), que muestran una organización molecular similar con dominios tipo cremallera de leucina y dominios ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina denominados dominios tipo PEST (por el código de una letra de la misma secuencia de aminoácidos), muy frecuentemente sufren modificaciones postraduccionales como fosforilaciones (Hansen & Nichols, 2010).

Poco se sabe de la función de las cavininas en la fisiología de la caveolas, pero se ha observado que Cavina-1 es requerida para la formación de la caveola de manera tan prominente, que la pérdida de esta proteína condiciona la pérdida de las caveolas (Briand *et al.*, 2011; Hansen & Nichols, 2010). También se ha visto que Cavina-1 está interactuando cercanamente con Cav-1 en el músculo liso y tejidos no musculares y con Cav-3 en el músculo esquelético (Hansen & Nichols, 2010).

Se ha descrito que Cavina-2 tiene una distribución más limitada que Cavina-1 y que su pérdida se ha asociado con la pérdida de la morfología esférica típica de las caveolas, dando como resultado estructuras alargadas de forma tubular (Briand *et al.*, 2011). La reducción en la expresión de la Cavina-2 también conduce a una disminución en la expresión de Cavina-1 y Cav-1 y se ha

observado por co-inmunoprecipitación que la Cavina-2 puede unirse directamente a la Cavina-1 y reclutar en la membrana aun en ausencia de Cav-1 (Briand et al., 2011; Hansen & Nichols, 2010). Tanto Cavina-3 como Cavina-4 respectivamente, se han relacionado con la formación de vesículas endocíticas y con caveolas citosólicas musculares respectivamente (Briand *et al.*, 2011).

CAVEOLAS Y EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.

El músculo liso tiene una participación importante regulando el diámetro de las vías aéreas y por tanto la cantidad de aire que éstas conducen, es por ello que es un elemento clave en la función pulmonar así como en el desarrollo de condiciones patológicas como la hiperreactividad de las vías aéreas en el asma.

Las células musculares lisas en las vías aéreas pueden presentar dos estados o fenotipos distintos, un estado contráctil o diferenciado y uno sintético o no diferenciado (Wright, Trian, et al., 2013). Las células de fenotipo contráctil se observan elongadas y expresan en su superficie receptores muscarínicos M3. La interacción de los receptores con proteínas del citoesqueleto (actina de músculo liso α y γ , cadena pesada de miosina, calponina, caldesmona) permiten a la célula alargarse y acortarse en respuesta a agonistas como la acetilcolina (Maniatis et al., 2012). En cambio las células de fenotipo sintético se observan aplanadas y con la capacidad de secretar mediadores, proliferar y migrar (Wright, Trian, et al., 2013).

Las caveolas se observan en muchos tipos celulares pero son particularmente abundantes en células musculares lisas en estado diferenciado,

es decir, en aquellas que muestran un fenotipo contráctil en oposición a uno de tipo sintético (Gosens et al., 2011; Maniatis et al., 2012). Estas invaginaciones de membrana en el músculo liso se caracterizan por la expresión de Cav-1, Cav-2 así como de Cavina-1,-2 y -3; también localizados en las caveolas se encuentran receptores y proteínas G que regulan la contracción del músculo liso en respuesta a agonistas contráctiles como metacolina, histamina y bradicinina (Gosens et al., 2011). Se sabe que en las vías aéreas humanas y caninas las caveolas están enriquecidas con un gran número de proteínas que manejan el Ca^{2+} incluyendo canales de Ca^{2+} tipo-L, proteínas de unión a Ca^{2+} como calsecuestrina y calreticulina y la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (Aravamudan et al., 2012; Darby, Kwan, & Daniel, 2000; Gosens et al., 2007). Lo anterior sugiere una fuerte relación entre las caveolas y sus proteínas (Cav-1 y cavininas) en la modulación de la contracción del músculo liso de las vías aéreas, por lo que si existe una alteración de las proteínas y la fisiología caveolar, los mecanismos de contracción podrían estar igualmente alterados originando condiciones patológicas como las enfermedades obstructivas, entre ellas el asma.

En apoyo a la idea de que los cambios en la expresión de Cav-1 y de cavininas son relevantes para el desarrollo de enfermedades y de que pueden relacionarse con procesos patológicos como la hiperreactividad en el asma bronquial, se ha descrito que en ratones transgénicos donde la expresión de Cav-1 o Cavina-1 ha sido bloqueada, se generan anomalías que incluyen intolerancia a la glucosa, dislipidemias, distrofia muscular leve, enfermedades vasculares, alteraciones urogenitales e incluso problemas oculares (Cohen et al.,

2004; Hansen & Nichols, 2010). También se ha observado que los niveles de Cav-1 descienden en tejidos humanos durante procesos como la oncogénesis o el desarrollo de enfermedades fibróticas como la fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, fibrosis cardiaca, cicatrización queloide y esclerosis sistémica (Gvaramia, Blaauboer, Hanemaaijer, & Everts, 2013).

JUSTIFICACIÓN

Poco se sabe de la función de las Cavininas y Cav-1 en procesos fisiopatológicos como la hiperreactividad de las vías aéreas en el asma, donde el principal mecanismo que participa es la hipercontracción del músculo liso de las vías aéreas, por ello se plantea el siguiente proyecto, para conocer la expresión de las cavininas en el músculo liso traqueal en un modelo de asma en cobayo.

HIPÓTESIS

La expresión de Cav-1 así como de las cavininas (-1, -2 y -3) como proteínas constituyentes de las caveolas posiblemente estará aumentada en cobayos con modelo de asma alérgica.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la expresión de Cav-1 y las cavininas-1, -2 y -3 y su distribución en las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo y compararla con un grupo control.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si los cobayos con modelo de asma desarrollan hiperreactividad de las vías aéreas.

- Evaluar la expresión de Cav-1, Cavina-1, -2 y -3 en miocitos traqueales de cobayos con modelo de asma y cobayos controles mediante la técnica de Western Blot y determinar si existen cambios.
- Localizar la expresión de Cav-1, Cavina-1, -2 y -3 en cortes de tejido pulmonar de cobayos con modelo de asma y al grupo control mediante IHQ.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron cobayos machos raza HsdPoc:DH con un peso promedio de 350 a 400 g que se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER): con un período de 12/12 horas de ciclo luz / 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. El número de individuos en cada muestra se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. *Diferentes tamaños muestrales utilizados en las distintas fases experimentales del estudio.*

Fase experimental	Tamaño de la muestra (n)	
	Control	Modelo de asma
Reactividad de la vía aérea	6	6
Western Blot	2	2
IHQ	3	3

SENSIBILIZACIÓN

En el día uno, los cobayos fueron inyectados por vía intradérmica e intraperitoneal con ovoalbúmina (OVA) (0.06 mg/mL, Sigma St Louis, EU) e $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante (1 mg/mL; J.T. Baker), disueltos en 0.5 mL de SSF (Solución salina fisiológica) (modificado de Campos *et al*, 2001).

PLETISMOGRAFÍA

El sistema de pletismografía está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión diferencial (SCXL004DN SenSym) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por un programa (Buxco Biosystem XA v1.1) instalado en una computadora. Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 mL o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10 %. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de evitar incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10 % de las respiraciones de cada período fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. Cada valor del ÍB (Índice de broncoobstrucción) fue el período de 15 s de lecturas y, de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período. Esto se realizó con el fin de evitar la influencia de eventos al estudio y mantener la posibilidad de detectar los cambios agudos.

Los fundamentos del ÍB se basan en que cuando el aire ambiental ingresa a los pulmones se calienta de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ a 37°C y se humidifican hasta el 100 %. En los sensores de la cámara de pletismografía este incremento en el volumen del aire torácico es registrado como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es temporal, pues disminuye conforme el cobayo exhala el aire. Debido a que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, durante la exhalación baja el volumen del aire y esto se registra como una disminución en la presión. De esta manera, aunque el transductor no

mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios el programa computacional puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración en el equipo previamente calibrado (Figura 4; Hamelmann *et al*, 1997). La información es procesada para dar el valor del \dot{V}_B que es obtenido con la siguiente fórmula:

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

Donde: T_e = Tiempo total espiratorio (s)

T_r = Tiempo total de relajación (s)

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

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

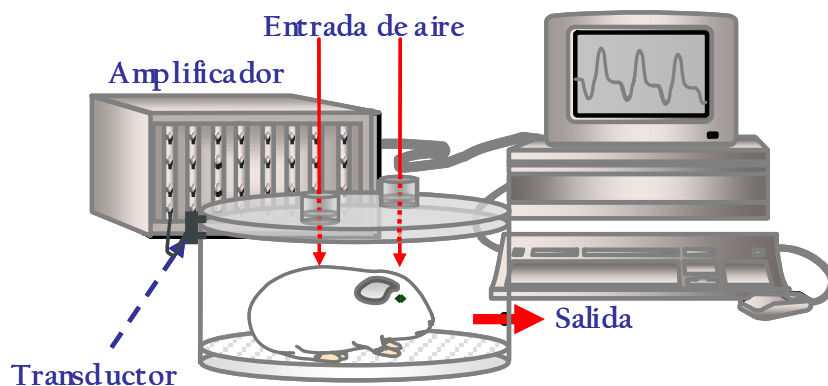


Figura 4 Equipo de plestismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de plestismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registrara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

cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

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

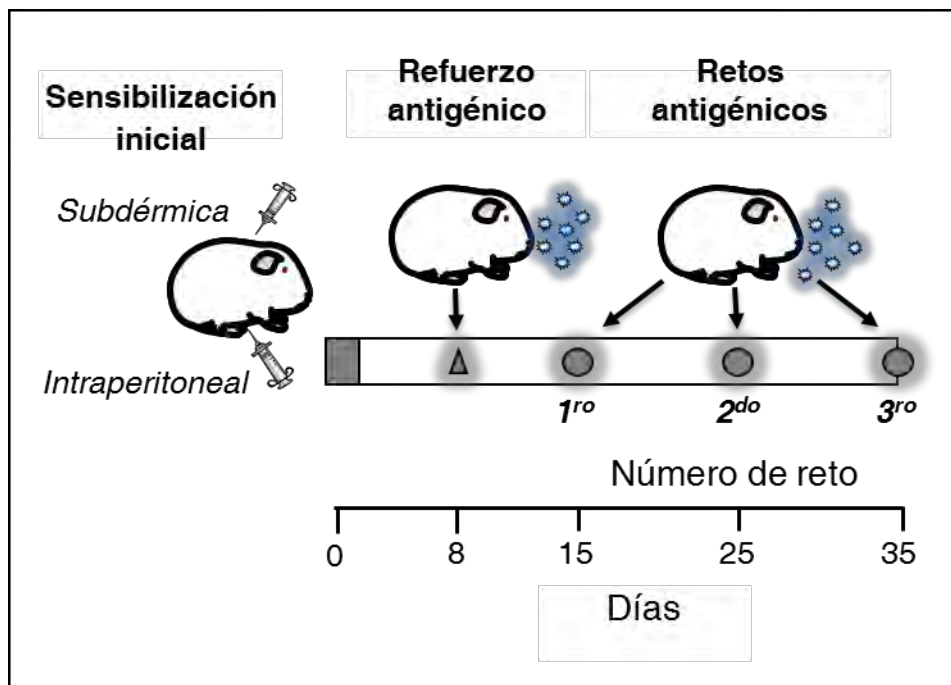


Figura 5 Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos en el modelo de asma alérgica.

En el día 15, los cobayos fueron expuestos nuevamente a aerosoles de OVA (1 mg/mL SSF) durante un minuto siguiendo el protocolo de pletismografía del día de refuerzo antigénico (día 8). Los cobayos fueron retados dos veces más, cada una a intervalos de diez días, usando 1 mg de OVA/mL de SSF, antes de ser sacrificados para obtener las muestras de tráquea. Un grupo adicional de cobayos que no fueron retados ni sensibilizados fueron incluidos en el estudio como controles.

REACTIVIDAD DE LA VÍA AÉREA

La reactividad de las vías aéreas fue evaluada en el grupo control y en el experimental durante el tercer reto antigénico (día 35) por medio de la comparación de las curvas dosis-respuesta a la histamina antes y después del reto con OVA. Para realizar dichas curvas inicialmente se obtiene el IB basal de los cobayos sucedido por la nebulización de aerosoles de dosis crecientes y no acumulativas de histamina (desde 0.013 mg/mL hasta 0.32 mg/mL) durante 1 min. Entre cada dosis se consideró un intervalo de 10 min. La curva fue detenida cuando el IB obtenido para determinada dosis triplicó el valor del IB basal. Una vez que el valor de IB correspondiente a dicha dosis disminuyó en un 50 % se procedió a aplicar el reto antigénico con OVA (1 mg/mL).

Una segunda curva fue realizada tres horas después del reto antigénico, con las mismas características que la primera.

EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Después de transcurridas 24 horas desde el último reto antigénico con OVA, los cobayos fueron sometidos a eutanasia por sobredosificación de pentobarbital sódico (28 mg/Kg). Una vez que presentaron paro cardiorrespiratorio se les realizó una incisión en el cuello para extraer la tráquea. Posteriormente se abrió el pecho para poder extraer una porción del lóbulo inferior del pulmón izquierdo. Esta porción se preservó en formalina para ser procesado en histología.

De la tráquea se eliminó la fascia superficial y se seccionó una porción de entre 3 y 4 anillos traqueales para realizar IHQ; dicha porción, al igual que el pulmón, fue preservada en formalina. Del resto de la tráquea se obtuvo sólo la tira de músculo liso para realizar el análisis de Western Blot.

WESTERN BLOT

La tira de músculo liso obtenida de la tráquea de los cobayos se agregó a una solución de lisis celular y se homogeneizó con la ayuda de un sonicador. Se hizo una cuantificación de proteínas totales en microplaca con la técnica modificada de Lowry (Assay DC). 40 µg de proteínas se corrieron en geles prehechos de poliacrilamida SDS 4-12 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bajo condiciones reductoras, posteriormente dichas proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF; BioRad). Las membranas fueron activadas con metanol y fueron bloqueadas con leche en polvo libre de grasas al 3 % en TBST (Tris 0.1 M, NaCl 0.05 M y 0.1 % de Tween 20), durante 2 horas a

37°C, en agitación. Las membranas se lavaron con TBST al 0.1 % y fueron incubadas toda la noche a 4°C en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: Cavina-1 (Anticuerpo policlonal anti-PTRF/Cavin-1 de humano hecho en conejo, Merck Millipore; 1:1000), Cavina-2 (Anticuerpo policlonal anti-SDR de humano hecho en conejo, ThermoFisher Scientific; 1:50), Cavina-3 (Anticuerpo policlonal anti-PRKCDBP de humano hecho en cabra, ThermoFischer Scientific; 1:1000) y Cav-1 (Anticuerpo policlonal anti-Caveolin 1 de humano hecho en ratón, BD Transduction; 1:500). Se utilizó como control de carga, la expresión de GAPDH (Anticuerpo monoclonal anti-GAPDH de humano hecho en ratón, Invitrogen; 1:500). Las membranas se volvieron a lavar con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-cabra, anti-ratón, o anti-conejo) acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a 37°C en agitación. Después de los lavados, las membranas se incubaron con un sustrato quimioluminiscente (20x LumiGLO® Reagent y 20x Peroxide; Cell Signaling) durante un minuto y medio. Transcurrido este tiempo las membranas fueron expuestas a una placa Amersham Hyperfilm (GE Healthcare) y fueron reveladas para realizar posteriormente el análisis de bandas por densitometría. Las imágenes de las reacciones reveladas en las placas radiográficas fueron documentadas y procesadas por medio de un dispositivo Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Segrate) usando el programa Quantity One 1D Analysis Software versión 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La presencia de cada una de las proteínas de interés fue evaluada a través del patrón de bandas detectadas por los anticuerpos específicos y mediante densitometría utilizando el software Image J, que permite convertir los

pixeles de la imagen de la banda en una variable indicativa de su intensidad para fines de su análisis cuantitativo y estadístico. Dichas intensidades se normalizaron con la intensidad de expresión de la proteína constitutiva GAPDH obteniendo de este modo un valor relativo de la expresión de la proteína a evaluar. Los datos fueron convertidos y graficados en barras para poder realizar la comparación del grupo experimental y el grupo control.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los anillos traqueales y las porciones del lóbulo inferior de pulmón izquierdo se fijaron en una disolución de formalina al 10 % y posteriormente fueron incluidos en parafina. Secciones de 3 μm se desparafinaron en una estufa a 55°C durante 30 min y se rehidrataron gradualmente en alcoholes desde xileno hasta etanol al 70 % y finalmente en agua destilada (10 min en cada paso). La recuperación antigénica se realizó en olla de presión utilizando el reactivo DIVA Decloaker (Biocare Medical) como solución buffer. Se utilizó H_2O_2 al 3 % en agua por 10 min para bloquear la peroxidasa endógena. Para detectar la unión específica de los anticuerpos primarios se utilizó el Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector Labs) en el cual los tejidos son incubados secuencialmente con suero bloqueador de caballo (2 %), el anticuerpo primario específico, un anticuerpo secundario universal y un complejo peroxidasa/estreptavidina. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. En este procedimiento se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Cavina-1 (Anticuerpo policlonal anti-PTRF/Cavin-1 de humano hecho en conejo, Merck Millipore; 1:1000), Cavina-2 (Anticuerpo policlonal anti-SDR de humano hecho en

conejo, ThermoFisher Scientific; 1:50), Cavina-3 (Anticuerpo policlonal anti-PRKCDBP de humano hecho en cabra, ThermoFischer Scientific; 1:1000) y Cav-1 (Anticuerpo policlonal anti-Caveolin 1 de humano hecho en ratón, BD Transduction; 1:500). Se utilizó 3,3'-diaminobenzidina (Vector Labs) como cromógeno para revelar y finalmente las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina QS modificada de Meyer (Vector Labs). Las laminillas fueron lavadas por duplicado con TBST entre cada paso. Como control de unión no específica del anticuerpo secundario, se incubaron secciones de los mismos tejidos con el suero bloqueador en lugar del anticuerpo primario. La intensidad de la reacción dada por el desarrollo de color fue evaluada a juicio del observador.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La reactividad de la vía aérea a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% (PD₂₀₀), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que el IB basal triplique su valor. Los valores en la figuras fueron expresadas como la media \pm el error estándar. Los datos fueron sometidos a la prueba de contraste de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinar si su distribución se ajustaba o no a una de tipo normal. La prueba arrojó que los datos se ajustan a una distribución normal por lo que las comparaciones entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba paramétrica no pareada de t de Student, que establece una significancia estadística de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

La reactividad de las vías aéreas aumentó (hiperreactividad) en los cobayos pertenecientes al grupo experimental (modelo de asma) y fue estadísticamente mayor comparado con el control. Esto quedó demostrado al comparar los cocientes de la dosis provocativa de histamina 200 (PD_{200}) después y antes de aplicar el reto antigénico con OVA. Los cobayos del modelo de asma presentaron una PD_{200} post-reto con OVA menor en comparación con la PD_{200} basal (Figura 6) lo que implica que necesitaron una dosis de histamina menor para triplicar el IB basal tras el reto con OVA. En el caso del grupo control la relación fue muy cercana a 1, es decir que la PD_{200} no difiere antes y después del reto antigénico.

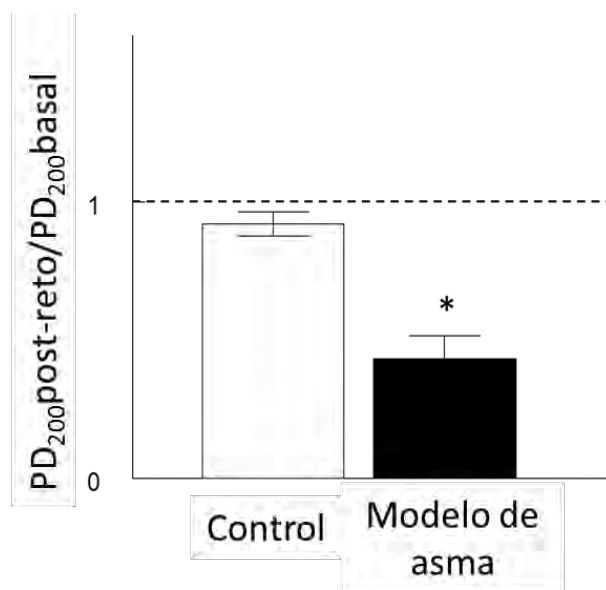
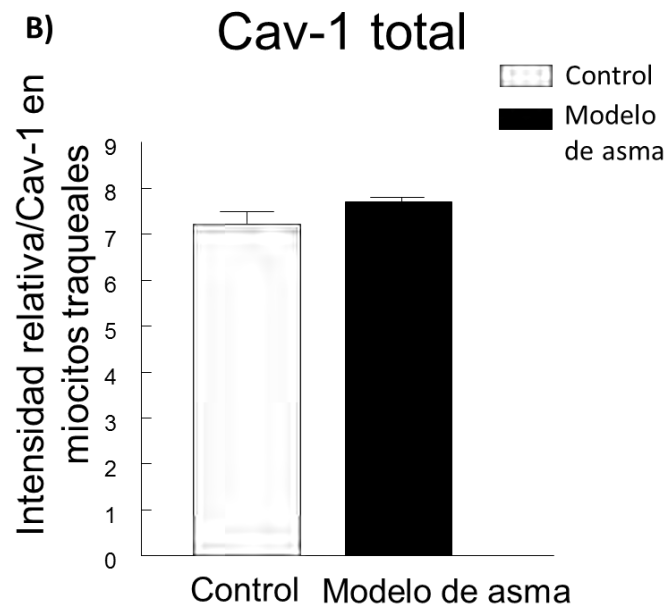
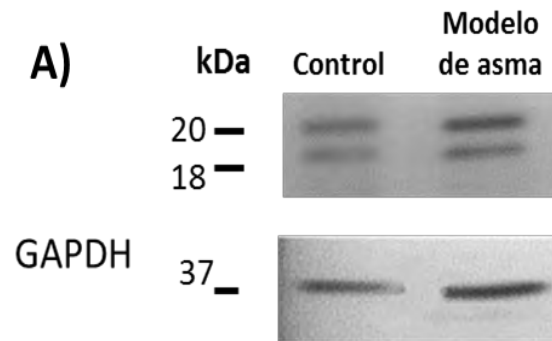


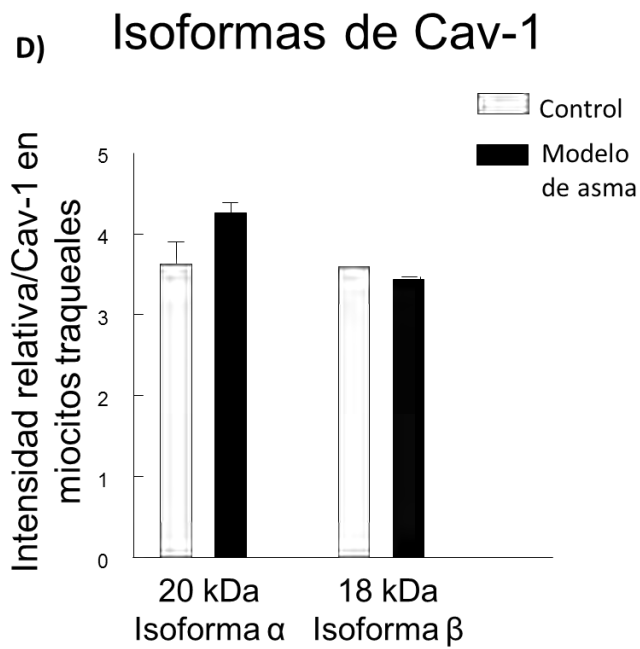
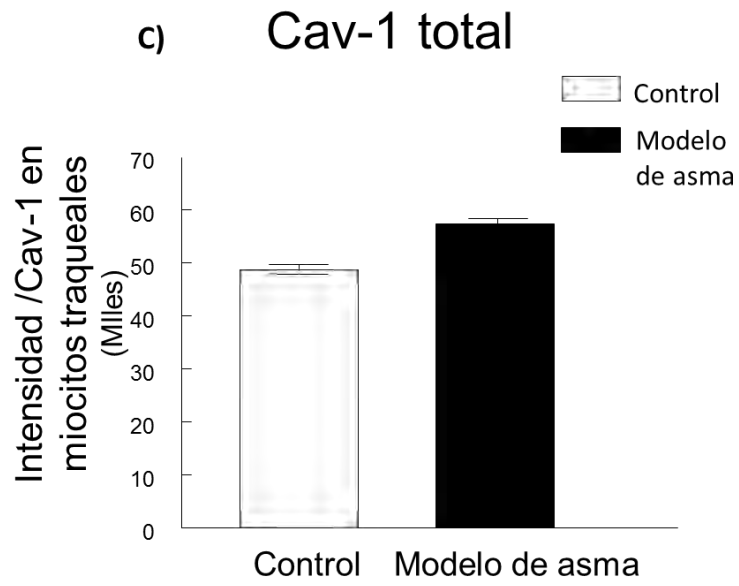
Figura 6 Reactividad de las vías aéreas a la histamina en el modelo de asma alérgica en cobayo. La gráfica muestra el cociente de la PD_{200} posterior al reto con OVA y el basal. La línea discontinua corresponde al límite entre hiporreactividad e hiperreactividad. $n=6$ para control y modelo de asma. * $p<0.05$ Prueba no pareada de t de Student.

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE CAV-1.

El anticuerpo específico para Cav-1 reveló la presencia de dos bandas tanto en el grupo control como en el modelo de asma, una correspondiente a un peso de 20 kDa (isoforma α) y otra de 18 kDa (isoforma β) (Figura 7A). Se evaluaron ambas bandas en conjunto para obtener la intensidad de Cav-1 total detectada en el músculo liso traqueal (Figura 7B), y se evaluó también cada banda por separado para obtener la intensidad de cada isoforma (Figura 7D). Por densitometría se encontró que en el modelo de asma la banda correspondiente a 20 kDa presenta mayor intensidad que en el control, aunque no mostró ser estadísticamente significativo. La banda correspondiente a 18 kDa presenta menor intensidad relativa comparada con la del grupo control (Figura 7D), no obstante, al observar la intensidad de la banda correspondiente a la isoforma β , pareciera que la expresión no desciende, en cambio pareciera aumentar o ser muy similar a la del grupo control. Para comparar si la expresión de Cav-1 tuvo cambios entre los grupos estudiados se evaluaron los valores obtenidos por densitometría respecto a una basal constitutiva (GAPDH) lo que se observa en las Figuras 7B y 7D, y sin esta basal, como se muestra en las Figuras 7C y 7E, debido a que sólo se tuvo acceso a resultados experimentales de GAPDH que no se realizaron al mismo tiempo que los experimentos de Cav-1. Esto permitió observar que sin considerar la normalización de GAPDH hubo un ligero incremento en el de la banda de 18 kDa en el modelo de asma respecto al control (Figura 7E), mientras que normalizando con GAPDH se ve un descenso de la expresión de la misma banda de 18 kDa con respecto al control (Figura 7D). Realizar un replanteamiento de

esta fase experimental podría aclarar si el factor de normalización condicionó que se observara un descenso y revelaría cuál es el verdadero comportamiento de la expresión de la isoforma β en el modelo de asma.





E) Isoformas de Cav-1

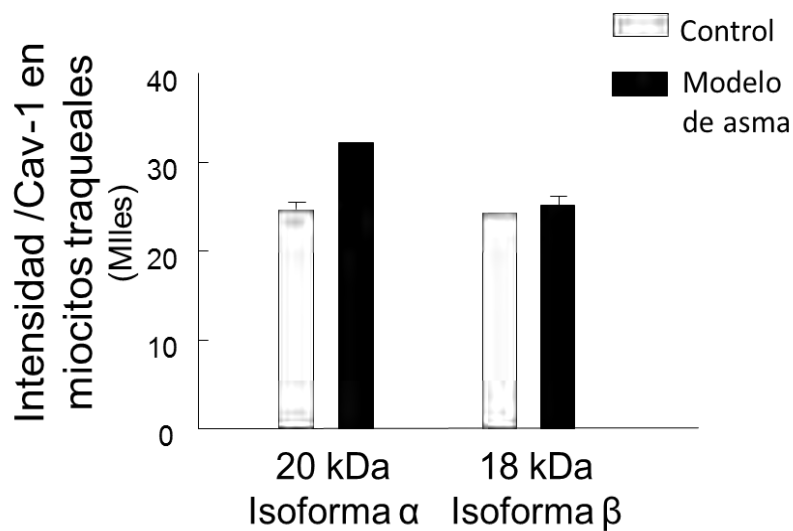
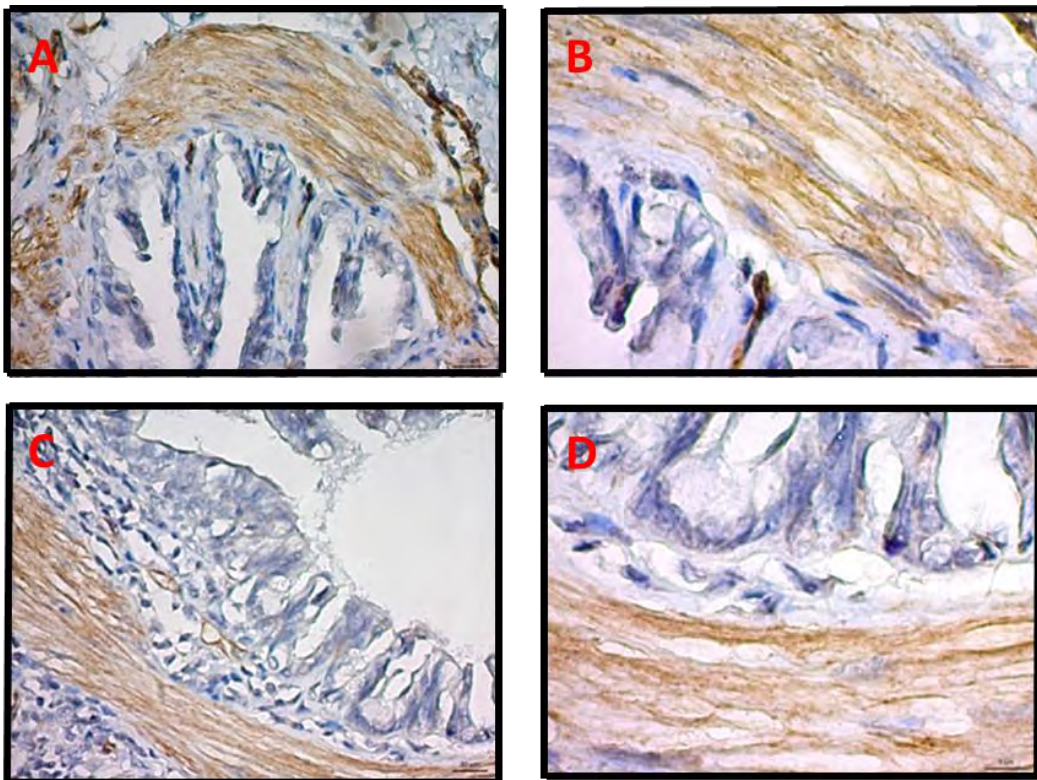


Figura 7 Determinación de la expresión de Cav-1 en miocitos traqueales de cobayo. (A) Western Blot representativo de tres repeticiones. (B) Intensidad relativa del total de Cav-1 expresada en el músculo liso traqueal de cobayo estandarizada con GAPDH. Para obtener la intensidad de Cav-1 total se sumaron las intensidades de las dos isoformas detectadas de la proteína. (C) Intensidad total de las bandas sin normalizar con la intensidad de GAPDH. (D) Intensidad relativa de la isoforma α y la isoforma β de Cav-1 por separado. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. $n=2$ para control y modelo de asma. (E) Intensidad de cada una de las bandas correspondientes a las isoformas de Cav-1 sin normalizar con la intensidad de GAPDH.

LOCALIZACIÓN DE CAV-1, EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.

Al ser importante la comparación de los grupos y no obstante las limitaciones que tiene una valoración visual al analizar la IHQ, se logró observar que en el músculo liso de las vías aéreas, tanto en bronquios como en bronquiolos, no hay cambios en las intensidades ni las localizaciones de las señales positivas dadas por el cromógeno que indiquen modificaciones en la distribución de Cav-1 en el modelo de asma comparado con el grupo control (Figura 8).



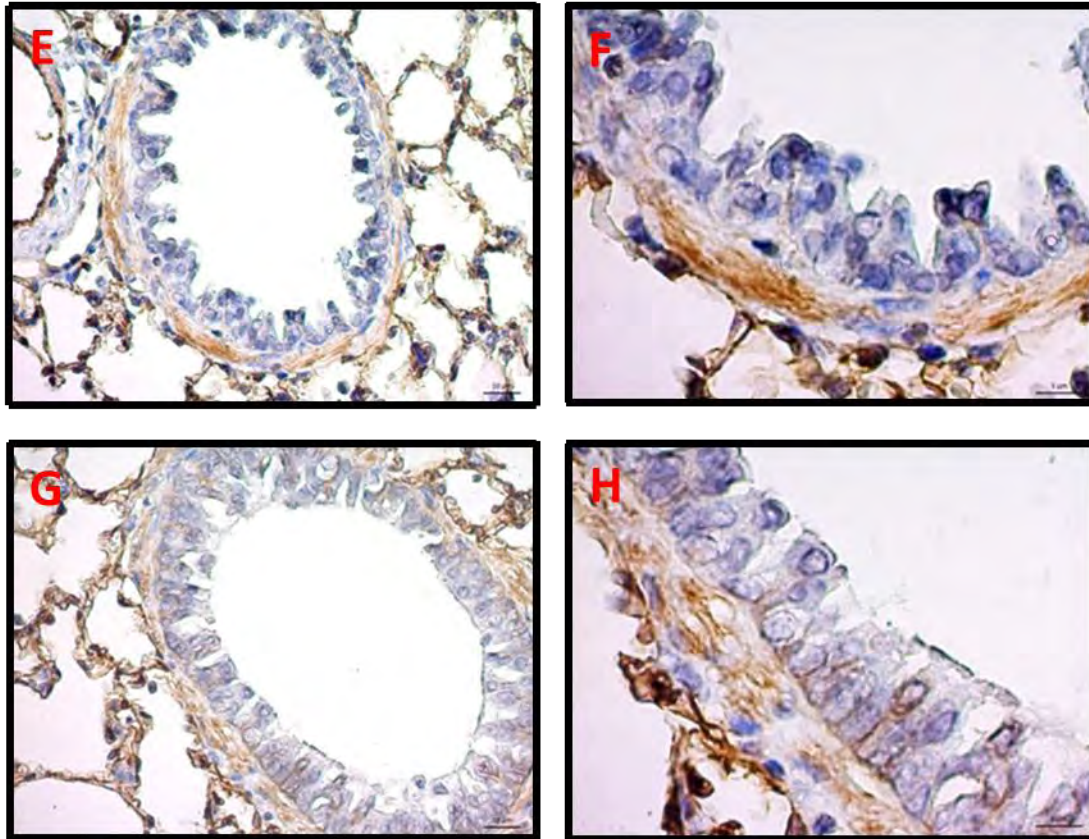
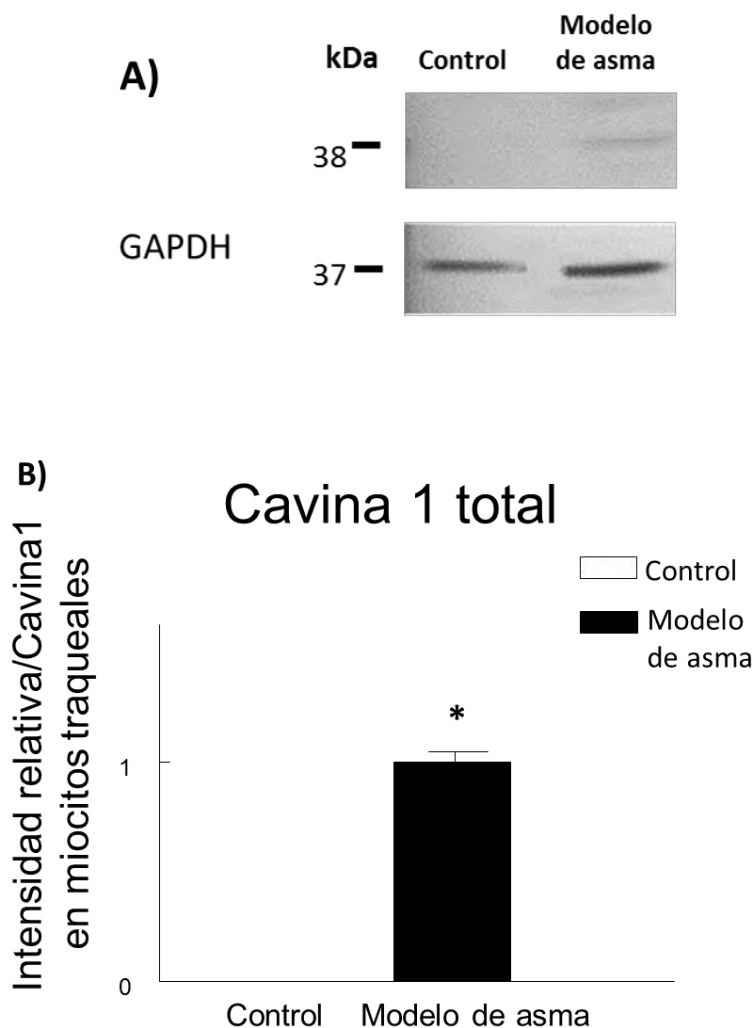


Figura 8 Localización de Cav-1 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo. (A-B) Micrografía de bronquio de cobayo de grupo control, 40x y 100x respectivamente. (C-D) Micrografías de bronquio de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. (E-F) Micrografías de bronquiolo de cobayo de grupo control, 40x y 100x. (G-H) Micrografías de bronquiolo de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE CAVINAS

El anticuerpo dirigido contra Cavina-1 reveló la presencia de una banda correspondiente a 38 kDa sólo para el modelo de asma, en el control no se detectó dicha banda (Figura 9A). La comparación entre grupos para las cavinas de nuevo se realizó considerando la normalización con GAPDH (Figura 9B) y sin ella (Figura 9C), por la misma razón metodológica que Cav-1. En ambos casos el cambio de la expresión en el modelo de asma fue estadísticamente significativo.



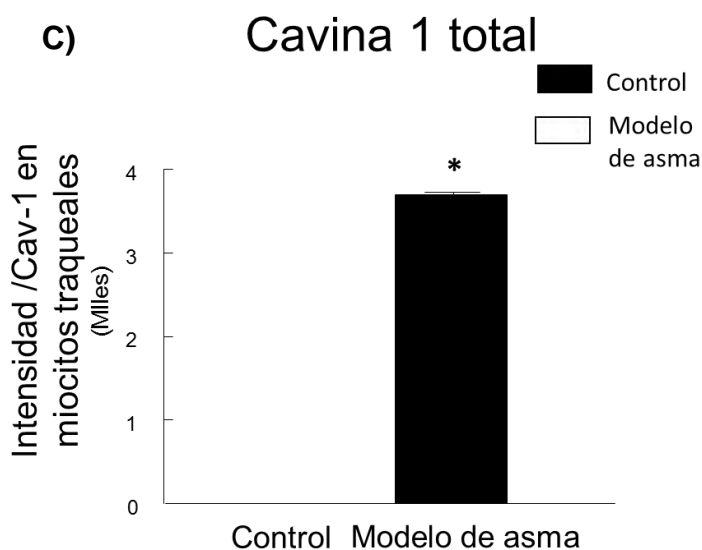
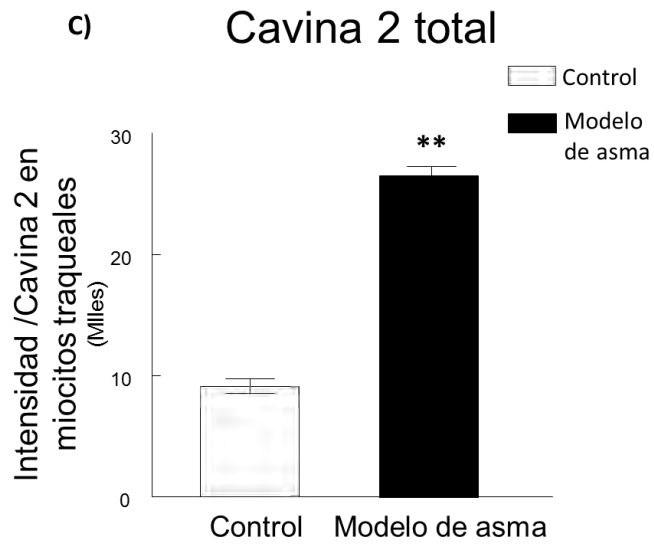
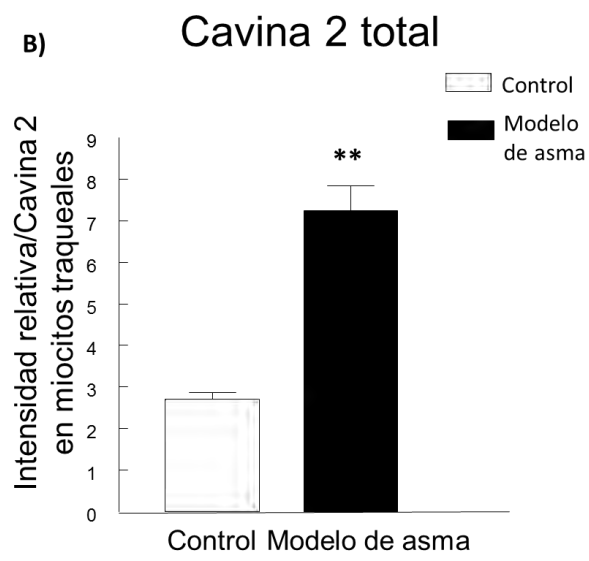
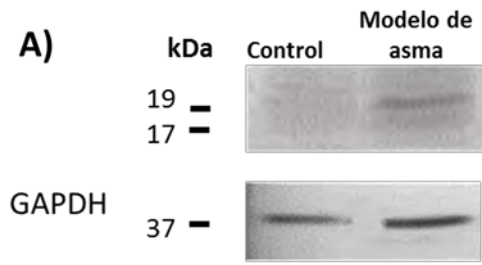


Figura 9 **Determinación de la expresión de Cavina-1 en el músculo liso traqueal de cobayo.** (A) Western Blot representativo de tres repeticiones. (B) Intensidad relativa de Cavina-1 total expresada en el músculo liso traqueal de cobayo estandarizada con GAPDH. (C) Intensidad total de la banda sin normalizar con la intensidad de GAPDH. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. $n=2$ para control y modelo de asma. * $p<0.05$ Prueba no pareada de t de Student.

Con el anticuerpo dirigido hacia Cavina-2 se detectaron dos bandas de 17 y 19 kDa respectivamente en el modelo de asma (Figura 10A). Cuando se realizó el análisis considerando la normalización con GAPDH la expresión total de Cavina-2 (Figura 10B) se vio aumentada en el modelo de asma debido a que las dos bandas mostraron una mayor intensidad comparadas con las del grupo control y este cambio fue estadísticamente significativo. La banda de 17 kDa no fue detectada en el control, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a 19 kDa en el modelo de asma aumentó de forma estadísticamente significativa comparada con la del grupo control (Figura 10D). También se realizó el análisis comparativo sin considerar la normalización de GAPDH y en ésta también se observó un aumento estadísticamente significativo tanto en la total como en las isoformas (Figura 10C y 10E respectivamente).



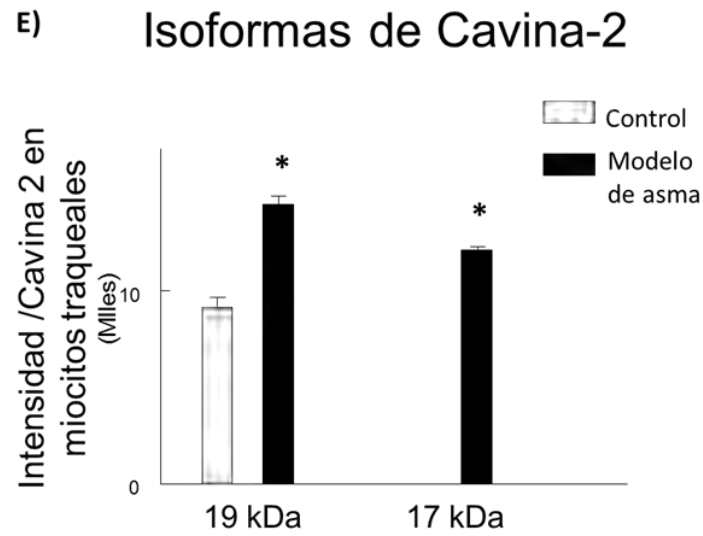
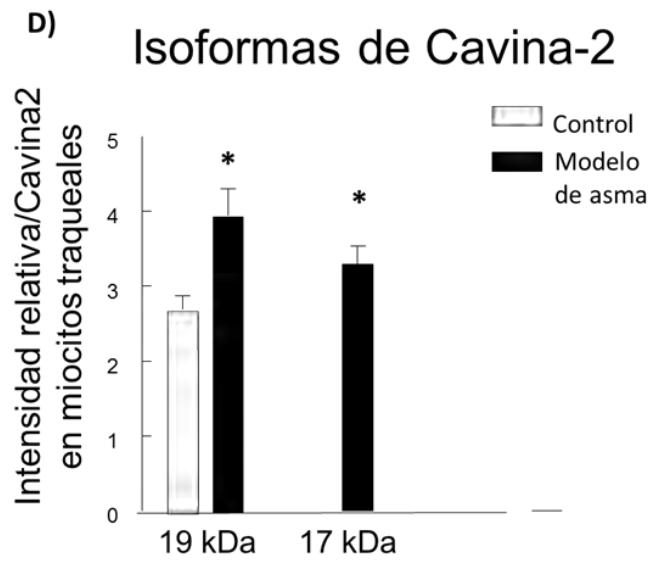
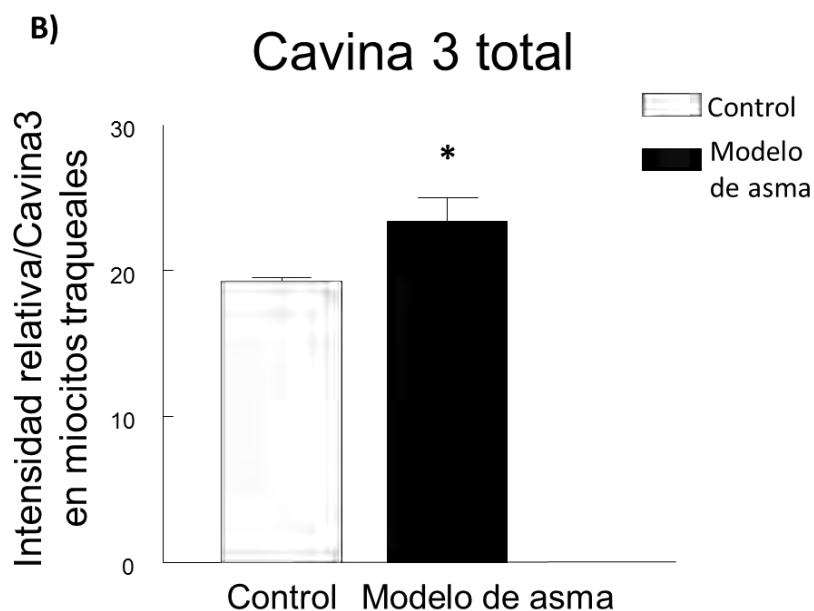
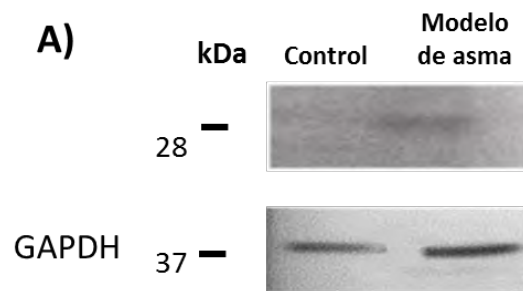


Figura 10 **Determinación de la expresión de Cavina-2 en el músculo liso traqueal de cobayo.** (A) WB representativo de tres repeticiones. (B) Intensidad relativa del total de Cav-1 expresada en el músculo liso traqueal de cobayo estandarizada con GAPDH. Para obtener la intensidad de Cavina-2 total se sumaron las intensidades de las dos isoformas detectadas de la proteína. (C) Intensidad relativa de las 2 isoformas de detectadas de Cavina-2 por separado .Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. n=2 para control y modelo de asma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ Prueba no pareada de t de Student.

Para el caso de Cavina-3 una banda fue evidenciada mediante el anticuerpo específico que corresponde a un peso de 28 kDa (Figura 11A). Por densitometría y al considerar la normalización con GAPDH, se encontró que la intensidad de la banda en el modelo de asma fue mayor (Figura 11B). El cambio es estadísticamente significativo cuando se compara con el grupo control. También en el análisis sin considerar la normalización con GAPDH el aumento resultó estadísticamente significativo (Figura 11C).



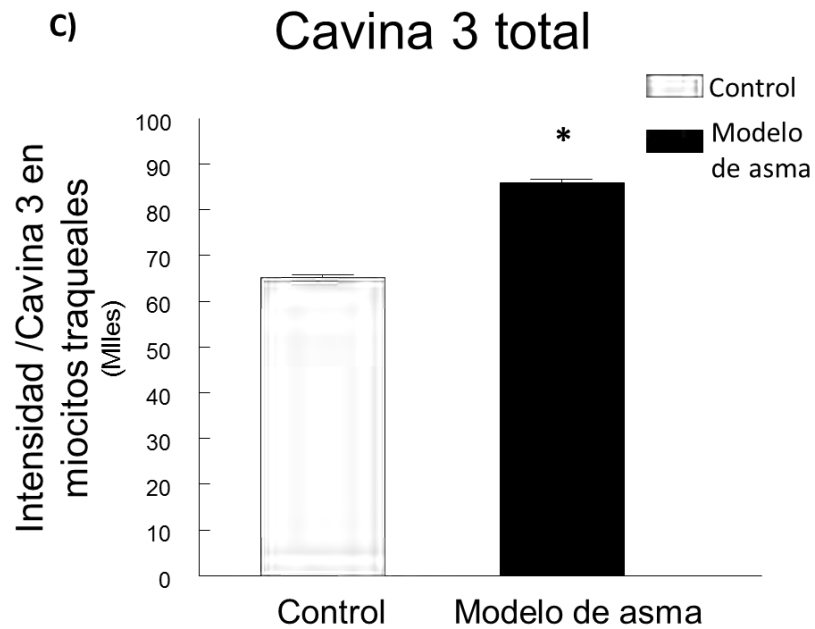
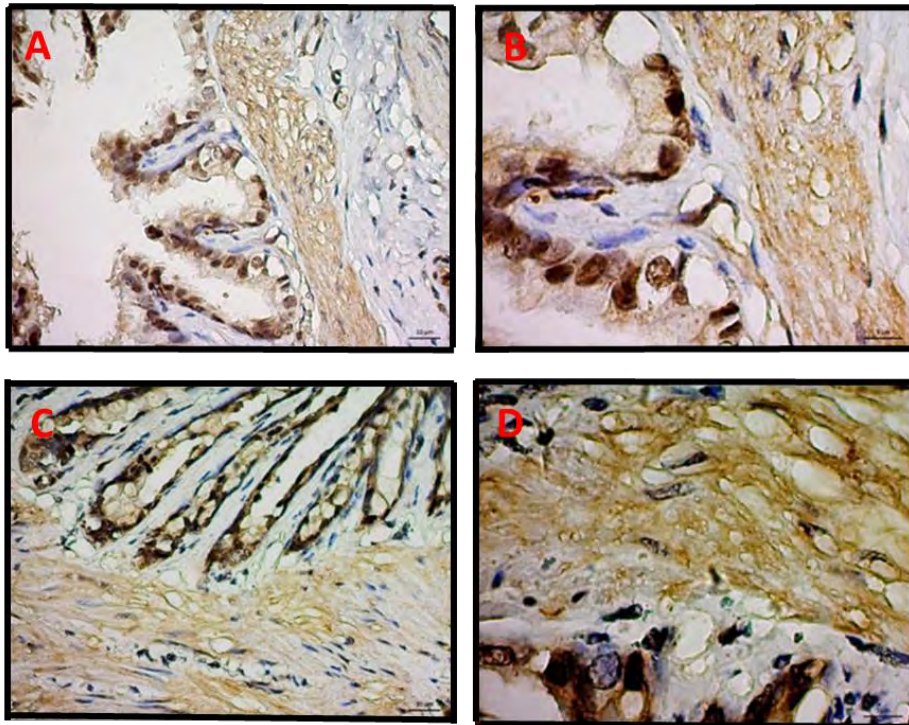


Figura 11 Determinación de la expresión de Cavina-3 en el músculo liso traqueal de cobayo. (A) WB representativo de tres repeticiones. (B) Intensidad relativa de Cavina-3 expresada en el músculo liso traqueal de cobayo estandarizada con GAPDH. (C) Intensidad total de la banda sin normalizar con la intensidad de GAPDH. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar. $n=2$ para control y modelo de asma. $*p<0.05$ Prueba no pareada de t de Student.

LOCALIZACIÓN DE CAVINAS EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

En el tejido pulmonar el anticuerpo específico para Cavina-1 evidenció la presencia de la proteína en el músculo liso de bronquios y bronquiolos, así como en el epitelio de los mismos en el modelo de asma y en el grupo control (Figura 12). A pesar de las limitaciones previamente mencionadas que derivan del método de valoración visual, podemos señalar que se observa que la intensidad de la señal positiva dada por el cromógeno en el tejido de los cobayos pertenecientes al modelo de asma es mayor comparada con la marca en los cortes del grupo control, especialmente en epitelio bronquiolar (Figura 12H)



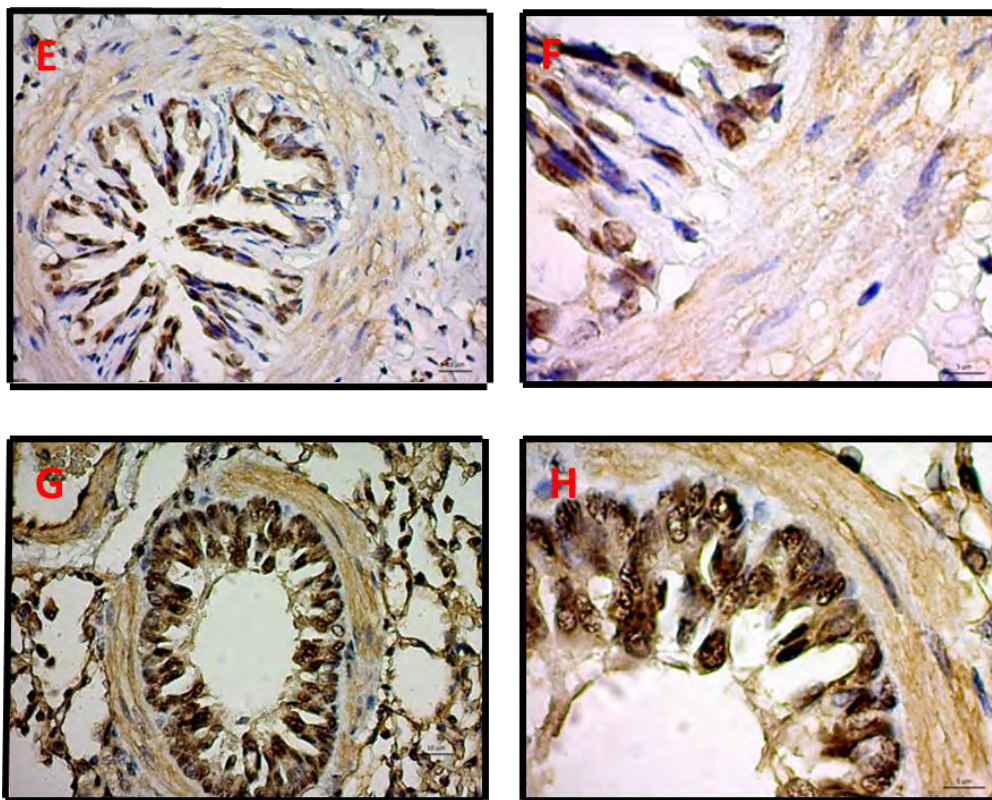
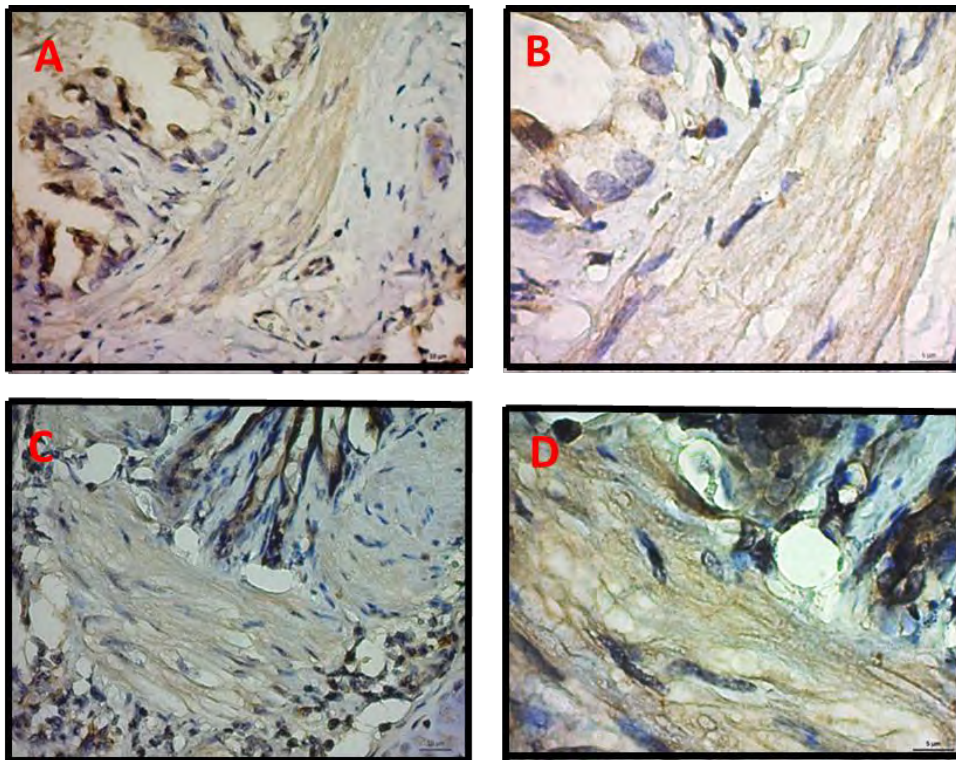


Figura 12 Localización de Cavina-1 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo. (A-B) Micrografía de bronquio de cobayo de grupo control, 40x y 100x respectivamente. (C-D) Micrografías de bronquio de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. (E-F) Micrografías de bronquiolo de cobayo de grupo control, 40x y 100x. (G-H) Micrografías de bronquiolo de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Cavina-2 también pudo ser detectada en el tejido pulmonar de cobayo en el músculo liso y en el epitelio de bronquios y bronquiolos de ambos grupos (Figura 13). La señal positiva en términos de intensidad y localización, como resultado de la reacción del cromógeno en nuestra valoración microscópica indicó que la presencia de Cavina-2 fue mayor en el modelo de asma comparado con el grupo control, nuevamente considerando las limitaciones derivadas de la subjetividad del método. La señal positiva en el epitelio de los bronquiolos en especial fue evidentemente más intensa en los cobayos del modelo de asma respecto a los controles.



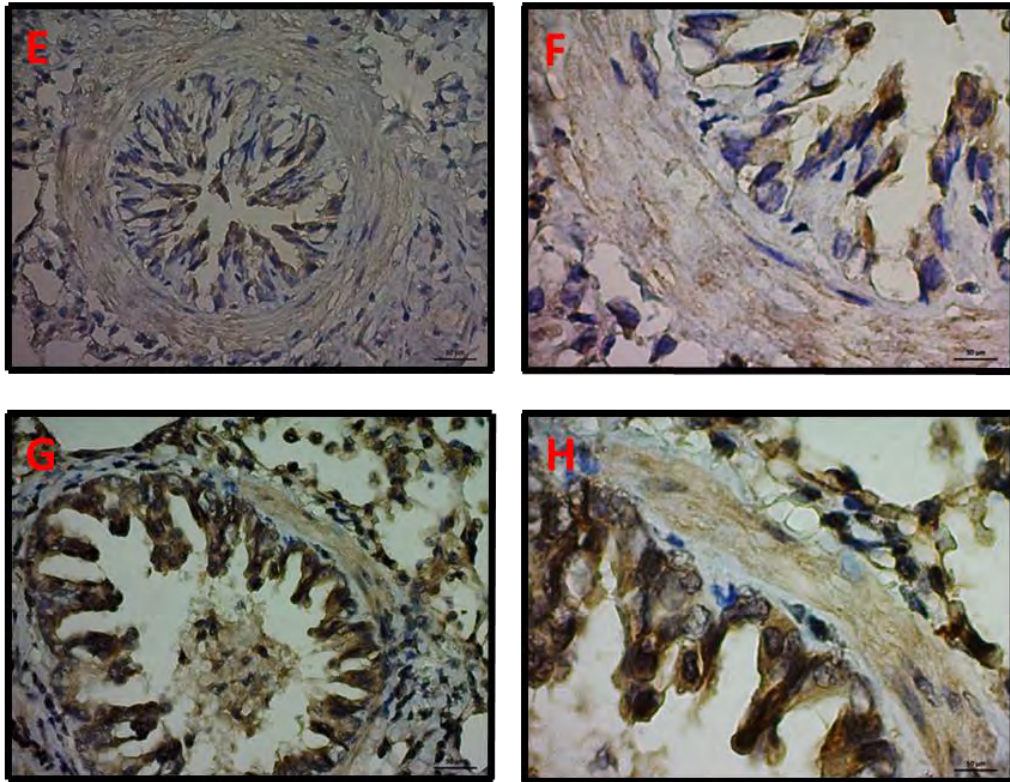
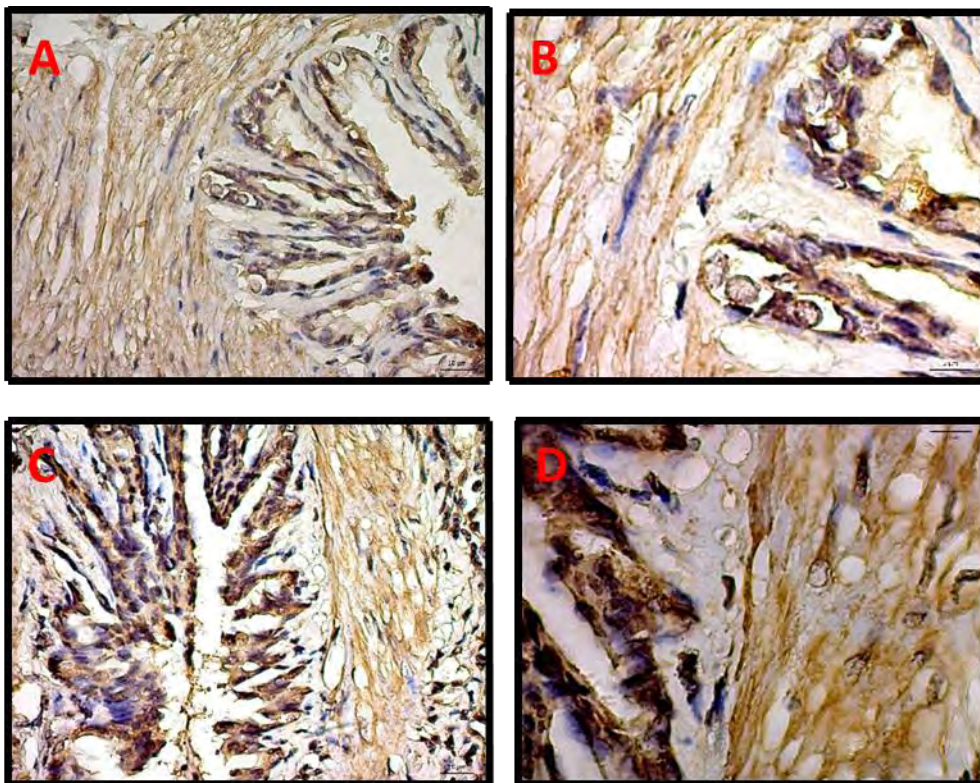


Figura 13 Localización de Cavina-2 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo. (A-B) Micrografía de bronquio de cobayo de grupo control, 40x y 100x respectivamente. (C-D) Micrografías de bronquio de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. (E-F) Micrografías de bronquiolo de cobayo de grupo control, 40x y 100x. (G-H) Micrografías de bronquiolo de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

La IHQ dirigida contra Cavina-3 también deja ver una señal positiva para dicha proteína en modelo de asma y grupo control (Figura 14). La señal positiva, en términos de su intensidad, dada por el cromógeno utilizado, indica que en el modelo de asma la presencia de Cavina-3 es mayor cuando se compara con el control, tomando en cuenta la subjetividad del método y las limitaciones que esto implica. Sin embargo, en ambos casos se observa una gran cantidad de proteína depositada en el músculo liso y en epitelio, tanto en bronquios como en bronquiolos.



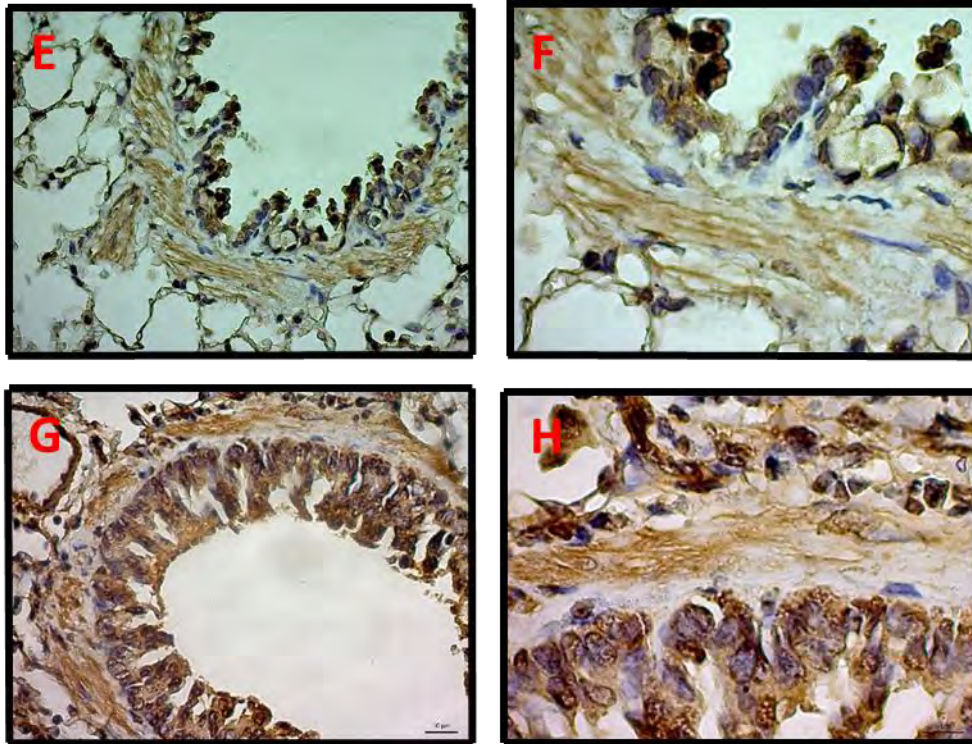


Figura 14 Localización de Cavina-3 mediante IHQ en tejido pulmonar de cobayo. (A-B) Micrografía de bronquio de cobayo de grupo control, 40x y 100x respectivamente. (C-D) Micrografías de bronquio de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. (E-F) Micrografías de bronquiolo de cobayo de grupo control, 40x y 100x. (G-H) Micrografías de bronquiolo de cobayo de modelo de asma, 40x y 100x. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Cada uno de los experimentos de IHQ se realizó con un correspondiente control negativo o blanco, en el cual los cortes recibieron leche al 3% en TBST en lugar del anticuerpo primario específico para cada proteína. Los controles negativos mostraron que no hubo unión inespecífica del anticuerpo secundario al no presentar reacción colorida al aplicar el revelador (Figura 15).

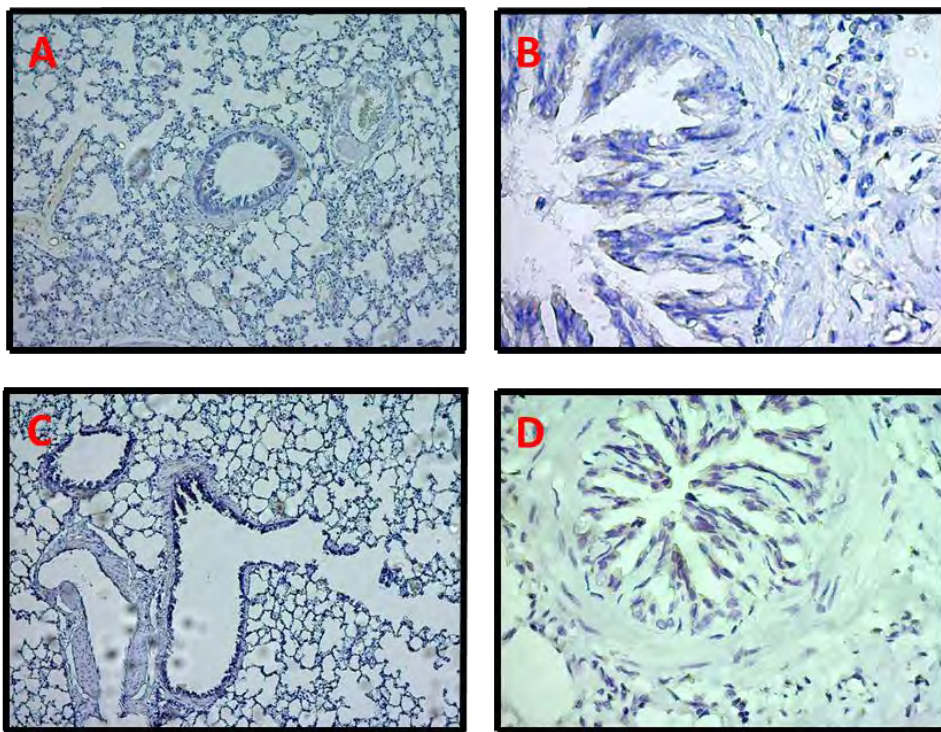


Figura 15 Control negativo (blanco) de las IHQ realizadas en cortes de pulmón de cobayo. (A-B) Micrografías correspondientes a pulmón de cobayo de modelo de asma, 10x y 40x respectivamente. (C-D) Micrografías correspondientes a pulmón de cobayo del grupo control, 10x y 40x respectivamente. Las imágenes mostradas son representativas, sin embargo, cada experimento de IHQ se realizó con su blanco correspondiente.

LOCALIZACIÓN DE CAV-1 Y CAVINAS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR EN EL PULMÓN.

Estudios previos de modelos de asma han revelado que Cav-1 se expresa de manera diferencial en el músculo liso que presenta distintos fenotipos (Gosens et al., 2011). En el músculo liso de las vías aéreas de cobayo de modelo de asma se ha encontrado que la expresión de Cav-1 está incrementada, al igual que la reactividad de las vías, mientras que en el músculo liso vascular de pulmón la expresión de Cav-1 disminuye (Álvarez-Santos et al., 2015). Dado que las cavinas se localizan en las caveolas al igual que Cav-1 se evaluó si su expresión también disminuye en el músculo liso vascular. El anticuerpo dirigido contra Cav-1 reveló que en este estudio la expresión de la proteína está disminuida en el modelo de asma en comparación con el grupo control (Figura 16A-B). Esta disminución es opuesta a lo que ocurre con las cavinas, ya que su expresión se observa incrementada en el modelo de asma, tanto en el músculo liso como en el endotelio (Figura 16C-H). Estudios de mayor sensibilidad y precisión sería necesarios para confirmar o refutar si Cavina-1, -2 y -3 se alteran en el modelo de asma como se ha descrito en otros estudios para Cav-1, donde la citometría de flujo ha permitido detectarse diferencias entre su expresión en el músculo liso de las vías aéreas y el músculo liso vascular.

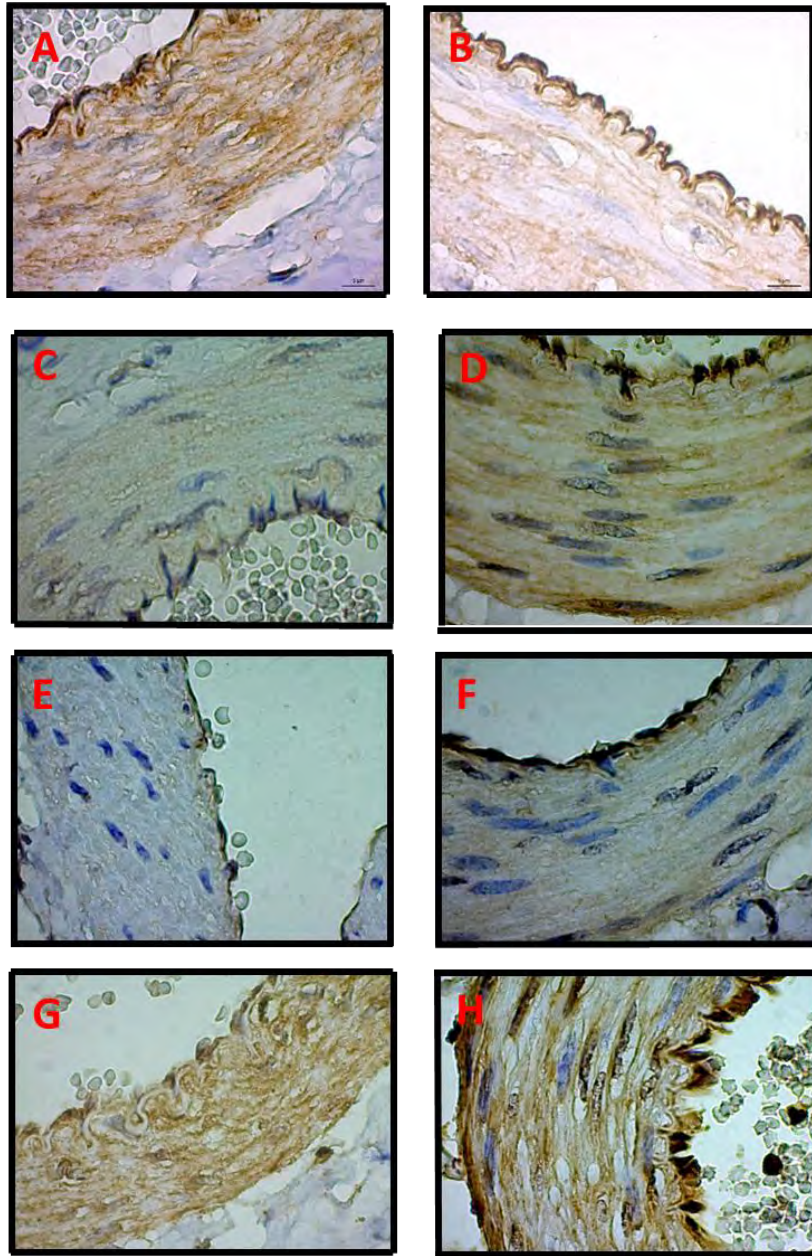


Figura 16 Distribución de Cav-1 y cavinas (-1,-2 y -3) en el músculo liso vascular de pulmón de cobayo. Localización de Cav-1 (A-B), Cavina-1 (C-D), Cavina-2 (E-F) y Cavina-3 (G-H). A, C, E y G corresponden a grupo control. B, D, F y H corresponden a modelo de asma. Micrografías con aumento de 100x. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que las proteínas que evaluamos (Cav-1, Cavina-1, -2 y -3), muestran una tendencia a aumentar en el músculo liso traqueal, así como en bronquios y bronquiolos de cobayos pertenecientes al modelo de asma, aunque los cambios observados en la expresión de Cav-1 no fueron estadísticamente significativos. Observamos que la expresión de una de las isoformas de Cav-1 en el músculo liso traqueal no varía igual que la otra en el modelo de asma comparado con el control, ya que mientras la isoforma α aumentó en el modelo de asma, la de la isoforma β es muy parecida entre grupos. Un estudio previo mostró que Cav-1 incrementa su expresión en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma (Álvarez-Santos et al., 2015) pero no hay reportes de cómo se expresa cada una de las isoformas en el modelo de asma. Los datos obtenidos nos pueden sugerir que tanto Cav-1 como Cavina-1, -2 y -3, proteínas relacionadas con el funcionamiento y organización de las estructuras denominadas caveolas, podrían tener una participación importante en el desarrollo del modelo de asma en el cobayo. Este modelo ha sido de gran utilidad para el estudio de la enfermedad gracias a las ventajas que presenta sobre otros modelos como el establecido en rata o ratón; una de ellas es que comparte algunas características farmacológicas con el asma en el humano, además de la fuerte respuesta obstructiva que presentan los cobayos después de la estimulación con el agonista (Canning BJ, 2008).

Hasta el momento no hay muchos reportes que indiquen como se están expresando Cav-1, Cavina-1, -2 y -3 en cobayos con modelo de asma. Estas proteínas son fundamentales para funciones celulares como la endocitosis, la proliferación celular o la migración y están involucradas en la contracción del músculo liso como el que está presente en las vías aéreas.

Por medio de Western Blot se detectaron en el presente estudio para Cav-1 en el músculo liso traqueal dos bandas correspondientes a 20 kDa y 18 kDa respectivamente, las cuales corresponden a las dos isoformas descritas en la literatura, la isoforma α (de migración lenta) y la isoforma β (de migración rápida) (Cohen *et al.*, 2004). Tras el análisis del Western Blot se observa que la expresión de Cav-1, evaluada por medio de la densitometría, aunque muestra una tendencia al aumento no presenta un cambio estadísticamente significativo en el modelo de asma comparado con el control. Sin embargo cuando se analizaron por separado cada una de las isoformas se observó que la expresión de la isoforma α aumenta en el modelo de asma mientras que la expresión de la isoforma β es bastante similar a la del grupo control. En estudios previos se observó un incremento en la expresión de Cav-1 en miocitos traqueales (Álvarez-Santos *et al.*, 2015) pero se sabe que la expresión de las isoformas de Cav-1 es diferencial en distintos tipos celulares y en determinados estadios de la vida de un organismo, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario en ratones ambas isoformas pueden ser detectadas en el pulmón a las 12.5 semanas, no obstante, después del nacimiento, la isoforma α sólo se detecta hasta pasados dos meses de vida en vasos sanguíneos y en células alveolares tipo I (Maniatis *et al.*, 2012). Aunado a

estas diferencias de expresión en diferentes tiempos y tipos celulares, se ha observado que ambas isoformas presentan la capacidad de fosforilarse en residuos de serina *in vitro*, pero sólo la isoforma β lo hace *in vivo* lo que sugiere que las isoformas de Cav-1 podrían tener funciones biológicas distintas y por tanto una expresión diferencial en los tejidos (Gupta *et al.*, 2014).

Se procedió posteriormente a localizar la expresión de Cav-1 en el tejido pulmonar por medio de IHQ. No fue posible observar algún cambio en la intensidad de la marca de Cav-1 en el músculo liso de las vías aéreas en cortes de pulmón cuando se comparó el modelo de asma con el control. Sin embargo en estudios previos las diferencias en la expresión sólo pudieron ser detectadas con técnicas de mayor sensibilidad como la citometría de flujo, con la cual se pudo observar que los miocitos traqueales en el modelo de asma en efecto incrementan la expresión de Cav-1 (Álvarez-Santos *et al.*, 2015).

Mediante el uso de animales transgénicos se ha descrito que Cav-1 tiene una participación determinante en la biogénesis de las caveolas en los tejidos que normalmente la expresan (Cohen *et al.*, 2004), como es el caso del músculo liso, el endotelio o el epitelio alveolar en el pulmón (Maniatis *et al.*, 2012). En el tejido muscular liso podría estar participando en el proceso de diferenciación celular ayudando al ligamiento e interacción de los receptores de superficie (como el receptor muscarínico M3) con las vías que comunican con los factores nucleares como es el caso de la vía RhoA/Rho cinasa. Esta vía parece necesitar a Cav-1 para activarse, pero otras vías como la PI₃ cinasa y el sistema SMAD son

inhibidas (Maniatis *et al.*, 2012), lo que indica que no sólo está participando en la diferenciación, sino también en la contracción muscular en respuesta a agonistas.

El hecho de que la expresión de Cav-1 se asocia a la contracción muscular parece evidente cuando se observa que esta proteína está expresándose en las caveolas junto a otras proteínas como bradicinina, los receptores H1 de histamina o los canales de Ca²⁺ operados por almacén, las cuales son participantes esenciales de los mecanismos de contracción del músculo liso (Prakash & Thompson, 2007). Tal relación llevaría a pensar que el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas podría estar ligado al aumento en la expresión de Cav-1 y a la consecuente falla de regulación de los mecanismos contráctiles (hipercontractilidad). Sin embargo, también se ha observado el desarrollo de hiperreactividad en modelos donde la expresión de Cav-1 disminuye o incluso está ausente (Aravamudan *et al.*, 2012). La expresión de Cav-1 mantiene en quiescencia a las células musculares con fenotipo contráctil al inactivar la señalización de la vía p42/p44 MAPK. Si Cav-1 disminuye su expresión el músculo liso puede proliferar modificando el grosor de la capa muscular. Esto último es un cambio asociado al proceso de remodelación de la vía aérea y este proceso es suficiente para que se desarrolle una condición de hiperreactividad al disminuir el calibre las vías y aumentar la resistencia del paso del aire (Cockcroft & Davis, 2006). Todo lo anterior sugiere que de cualquier modo los cambios en la expresión de Cav-1 pueden ser determinantes en el desarrollo de enfermedades como el asma.

Una proteína que interactúa fuertemente con Cav-1 en la formación de las caveolas es Cavina-1. Al analizar la expresión de Cavina-1 por medio de Western Blot en los miocitos traqueales de cobayo, no se detectó su expresión en el tejido de los cobayos controles, a diferencia del modelo de asma en donde observamos la presencia de una banda correspondiente a 38 kDa. Esta forma tiene un peso que coincide con el peso reportado para Cavina-1 en cobayo (www.ensembl.org), por lo que podríamos pensar que si se trata de Cavina-1. Sin embargo en los cortes de pulmón, al realizar la IHQ, se observó la expresión de Cavina-1 tanto en los cobayos controles como en los del grupo con modelo de asma. A nivel de bronquios y de bronquiolos se observa un aumento en la expresión de ésta proteína en el modelo de asma comparado con el grupo control aunque cabe considerar la subjetividad del método de evaluación visual. Llama la atención sin embargo que el cambio es más evidente en el epitelio que en el músculo liso, mas, pareciera lógico suponer que un tejido caracterizado por el transporte de sustancias como es el epitelial tuviera abundantes estructuras endocíticas como las caveolas, y consecuentemente abundante expresión de sus proteínas constituyentes como Cavina-1. Se ha descrito que la expresión de Cavina-1 es crítica para la formación de caveolas en todos los tipos celulares, es decir, donde no se expresa dicha proteína se observa una pérdida total de caveolas morfológicamente reconocibles, a nivel de cultivos celulares y en sistemas animales (Briand *et al.*, 2011; Hansen & Nichols, 2010; Parton & del Pozo, 2013). La pérdida total de Cavina-1 también conlleva a la disminución de los niveles de Cav-1, promoviendo su liberación desde el complejo de las caveolas, su

endocitosis y su degradación (Parton & del Pozo, 2013). No obstante Cav-1 puede encontrarse en la célula fuera de los complejos caveolares cumpliendo otras funciones (Nabi, 2009). En este modelo de asma en cobayo, observamos un aumento en la expresión de Cavina-1 lo que podría representar un aumento en la abundancia de las caveolas. Esto podría representar a su vez un aumento en la transducción de señales contráctiles lo que conllevaría a la hiperreactividad de las vías aéreas.

Diversos estudios muestran que Cavina-1 es reclutada en las caveolas gracias a la unión directa con Cavina-2, incluso en ausencia de Cav-1 (Hansen & Nichols, 2010). Las dos bandas detectadas por medio de Western Blot en este estudio con el anticuerpo dirigido contra Cavina-2, fueron identificadas con un peso molecular de 17 y 19 kDa respectivamente en el modelo de asma; en el grupo control la banda de 17 kDa no fue detectada, sólo la de 19 kDa. Sin embargo, estas dos isoformas encontradas en este estudio, no han sido reportadas previamente en la literatura. La única isoforma reportada en cobayo tiene un peso aproximado de 45 kDa (www.ensembl.org) aunque se ha descrito que usando diferentes anticuerpos se pueden detectar bandas con diferentes pesos moleculares (Hansen & Nichols, 2010). La expresión de dichas isoformas, evaluadas por densitometría, muestra un incremento estadísticamente significativo, en el modelo de asma comparado con el control. El fenómeno se observa al medir la expresión total de la proteína y al medir por separado cada una de las isoformas halladas, además una de las bandas (17 kDa) sólo se expresa en el modelo de asma. El aumento fue reconocible en bronquios y bronquiolos por

IHQ, no obviando las limitaciones metodológicas de la valoración visual, pero el cambio más notable entre controles y el modelo de asma se observa a nivel de epitelio más que en el músculo liso. El aumento está en concordancia con lo encontrado al respecto de Cavina-1, ya que se ha observado por co-inmunoprecipitación que ambas proteínas se encuentran unidas en el complejo caveolar a través de sus regiones N-terminal, y que los cambios en la expresión de Cavina-2 inciden directamente en la expresión de Cavina-1 al estar funcionando como su reclutador en la membrana, incluso en la expresión de Cav-1 al ser esta última interdependiente a la expresión de Cavina-1. (Briand *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2014). Por lo anterior, se podría pensar que la expresión de alguno de los miembros del complejo proteico que constituye a las caveolas estaría regulando de manera importante la expresión de los otros miembros y que la estequiometría entre las diferentes cavinas es determinante para la funcionalidad de las caveolas (Briand *et al.*, 2011; Nabi, 2009). Sin embargo, a diferencia de Cav-1 y Cavina-1, un aumento en la expresión de Cavina-2 no representaría un incremento en el número de caveolas, sino un cambio en la morfología de las caveolas existentes en el tejido lo que indica la participación de esta proteína en el establecimiento de la morfología de las caveolas (Briand *et al.*, 2011; Hansen & Nichols, 2010; Nabi, 2009).

El otro miembro del complejo caveolar en tejidos diferentes al músculo esquelético es Cavina-3. En el caso de Cavina-3, el peso molecular encontrado por el análisis de Western Blot en este estudio, coincide también con el reportado en la literatura para cobayo que es de 27 kDa (www.ensembl.org). Se ha

propuesto, que por splicing alternativo se podrían generar hasta cinco isoformas entre los 14.3 kDa y los 31.1 kDa (Briand *et al.*, 2011), lo cual explicaría la presencia de otras bandas de diferente peso molecular. La expresión de la proteína presentó un incremento estadísticamente significativo en el modelo de asma con respecto al grupo control. Este mismo hecho es apoyado por lo encontrado en la realización de la IHQ, en donde la intensidad de la señal positiva sobre el tejido aunque fue muy similar entre grupos se aprecia mayor en el modelo de asma. Un estudio de mayor sensibilidad como citometría de flujo permitiría confirmar el aumento. Lo que sí fue evidente y llama la atención es la gran concentración de esta proteína que se puede apreciar en bronquios y bronquiolos tanto en músculo liso como en células epiteliales. Cavina-3 es una proteína que necesariamente se encuentra localizada en el complejo caveolar incluso cuando la caveola se desprende para formar vesículas (Gupta *et al.*, 2014; Hansen & Nichols, 2010). Algunos estudios aseveran que el tráfico endocítico a través de caveolas se ve seriamente afectado cuando esta proteína se encuentra ausente, lo que sugiere que el papel preponderante de Cavina-3 en la fisiología caveolar es el de acoplar a la caveola a la maquinaria del transporte intracelular (Briand *et al.*, 2011; Hansen & Nichols, 2010). Se ha documentado que Cavina-1 dirige a Cavina-3 hacia la caveola donde está interactuando con Cav-1 a través del dominio de andamiaje de esta última promoviendo la dinámica caveolar (Mohan, Moren, Larsson, Holst, & Lundmark, 2015) por lo tanto se esperaría que la tendencia a aumentar de Cavina-1 se refleje también como una tendencia al aumento de Cavina-3.

El estado de las cavininas antes mencionadas también se analizó de manera general por medio de la IHQ en el músculo liso vascular en el pulmón ya que existía el antecedente en la literatura de que Cav-1 está expresándose diferencialmente en el músculo liso de las vías aéreas y en el músculo liso vascular, aumentando su expresión en las estructuras de conducción de aire y disminuyéndola en las estructuras vasculares (Álvarez-Santos et al., 2015) . Lo que se observó en cuanto a las cavininas fue un fenómeno muy similar al observado en el músculo liso de las vías aéreas, aunque cabe recalcar que la expresión de las cavininas es muy alta en el endotelio. Esta diferencia con respecto a la expresión de Cav-1 en el músculo liso de las vías aéreas y en el músculo liso vascular podría ser explicada si las cavininas no comparten la función preponderante que Cav-1 podría estar cumpliendo en el establecimiento del fenotipo que adoptan los dos tipos de músculo liso, ya que en las células de fenotipo contráctil Cav-1 ayuda a mantener la quiescencia característica de las células en estado diferenciado, mientras que en el fenotipo sintético tal función debe ser suprimida para permitir la proliferación (Gosens *et al.*, 2011). De cualquier modo también en el músculo liso vascular se está observando un cambio en el patrón de expresión de cavininas cuando se establece el modelo de asma, lo que podría estar alterando de igual modo su fisiología. Cabe aclarar una vez más que la evaluación realizada en este estudio de las IHQ es muy susceptible a la subjetividad del observador, por lo que es necesario plantear nuevos análisis de mayor sensibilidad que permitan confirmar o no las alteraciones en la expresión de estas proteínas caveolares y su asociación a los procesos de enfermedad relacionados con el asma.

Las cavininas son proteínas altamente conservadas presentes en todos los vertebrados e indispensables para la formación de caveolas en los mamíferos. Se encuentran formando complejos multiméricos y muestran patrones de expresión específicos en diferentes tipos de tejidos lo que sugiere que dichos complejos que se asocian a las caveolas son diferentes dependiendo de las necesidades del tejido (Hansen & Nichols, 2010). Por ejemplo, Cavina-2 se expresa en altos niveles en pulmón y tejido adiposo pero está pobremente expresada en el endotelio del corazón. Se sabe que Cavina-1, presente en todos los tipos celulares, forma complejos homo-oligoméricos que son capaces de unirse con Cav-1 para desencadenar la formación de caveolas, y que está formando complejos con las otras cavininas para que éstas puedan ser reclutadas en la membrana. Cavina-3 interactúa con trímeros de Cavina-1 a través de su región N-terminal para formar complejos hetero-oligoméricos, compitiendo por estos sitios con una región homóloga de Cavina-2, lo que sugiere que al menos Cavina-2 y Cavina-3 estarían cumpliendo roles regulatorios distintos en la cubierta caveolar (Mohan et al., 2015). Dichos complejos multiméricos podrían estar formándose en el citosol y posteriormente asociarse con el andamiaje formado por la caveolinas en la membrana celular para establecer la curvatura y determinar la retención o el desprendimiento de la caveola (Briand *et al.*, 2011). De este modo la interacción de ambos grupos de proteínas es crucial para el correcto funcionamiento de las estructuras caveolares.

Las alteraciones en la expresión de alguno de los miembros del complejo caveolar, ya sea una sobreexpresión o una disminución de la misma afecta

severamente la dinámica de las caveolas, lo que indica que la proporción que guardan los distintos elementos podría estar afectando la funcionalidad de la estructura como un todo (Briand *et al.*, 2011; Nabi, 2009). En un estudio realizado en un modelo murino de sensibilización a OVA, la expresión de Cav-1 en el músculo liso de las vías aéreas incrementó, del mismo modo que la expresión de las cavininas, mientras que mediante el uso de ratones transgénicos la inhibición del gen para Cav-1 fue suficiente para que la expresión de las cavininas en el músculo liso de las vías aéreas disminuyera significativamente (Aravamudan *et al.*, 2012). De este modo, se podría pensar que la alteración en la expresión de cualquiera de los miembros del complejo caveolar, como Cav-1 o alguna de las cavininas en el modelo de asma puede estar condicionando el desarrollo de la obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas que presentan los cobayos en este estudio.

Esta interacción y procesamiento de señales ambientales en los que participan las caveolas, las caveolinas (específicamente Cav-1) y las cavininas, parecen ser entonces determinantes en la diferenciación y función del músculo liso y podrían ser mecanismos que se encuentran afectados durante procesos patogénicos como el engrosamiento de la capa muscular en el tejido vascular y la hiperreactividad de las vías aéreas, los cuales son claves en el desarrollo de los síntomas de asma (Maniatis *et al.*, 2012)

CONCLUSIONES

Los cobayos con modelo de asma desarrollaron hiperreactividad de las vías aéreas.

La expresión de Cav-1 no mostró cambios estadísticamente significativos entre el modelo de asma y el grupo control, aunque se observó una tendencia a incrementar en el modelo de asma.

La expresión de Cavina-1, -2 y -3 fue mayor en el músculo liso de tráquea de cobayos con el modelo de asma comparado con el control, siendo dicho cambio estadísticamente significativo. En bronquios y bronquiolos también se observa un aumento de la expresión, que es más evidente a nivel de epitelio en bronquios y bronquiolos evaluado por IHQ

La IHQ en cortes de pulmón, reveló una alta concentración de Cavina-3 en el epitelio y el músculo liso de bronquios y bronquiolos.

El músculo liso vascular en el pulmón presenta un patrón en la expresión de cavinas que es opuesto al patrón que presenta Cav-1 en este mismo tejido, es decir, mientras que la expresión de Cav-1 disminuye en el modelo de asma, la expresión de cavinas parece estar incrementada.

REFERENCIAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (2002). *Inmunología celular y molecular*. Madrid: McGrawHill Interamericana.

Álvarez Santos, M., Ramos Ramírez, P., Gutiérrez Aguilar, F., Sánchez Hernández, S., Lascurain, R., Olmos Zuñiga, R., Jasso Victoria, R., Bobadilla, N. A., Bazán Perkins, B. (2015). Antigen-induced airway hyperresponsiveness and obstruction is related to caveolin-1 expression in airway smooth muscle in a guinea pig asthma model. *Clinical and Translational Allergy*, 5(1), 14.

Aravamudan, B., VanOosten, S. K., Meuchel, L. W., Vohra, P., Thompson, M., Sieck, G. C., ... Pabelick, C. M. (2012). Caveolin-1 knockout mice exhibit airway hyperreactivity. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(8), L669–L681.

Barnes, P. J. (1996). Pathophysiology of asthma. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 42(1), 3–10.

Blume, C., & Davies, D. E. (2013). In vitro and ex vivo models of human asthma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 84, 10–16.

Briand, N., Dugail, I., & Le Lay, S. (2011). Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie*, 93(1), 71–7.

Canning BJ, C. Y. (2008). Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.*, 21, 702–20.

Chen, C.-M., Wu, M.-Y., Chou, H.-C., Lang, Y.-D., & Wang, L.-F. (2011). Downregulation of caveolin-1 in a murine model of acute allergic airway disease. *Pediatrics and Neonatology*, 52(1), 5–10.

Cockcroft, D., & Davis, B. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(3), 551–559.

Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, 84(4), 1341–79.

Constanzo, L. S. (2000). *Fisiología. México*: McGrawHill Interamericana.

Darby, P. J., Kwan, C. Y., & Daniel, E. E. (2000). Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca²⁺ handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(6), 1226–1235.

De Zúbiria C., E. (2004). Patogenia. In *Asma bronquial* (2ª ed., pp. 82–97). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.

De Zúbiria S., E. (2004a). Asma e inflamación. In *Asma bronquial* (2ª ed., pp. 98–114). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.

De Zubiría S., E. (2004b). Patología del asma. In *Asma bronquial* (2ª ed., pp. 66–81). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2002). *Texto atlas de Histología* (2ª ed.). México: McGrawHill Interamericana.

GINA. (2011). *Global strategy for asthma management and prevention*. Bethesda, MD: National Institutes of Health.

Gosens, R., Stelmack, G. L., Bos, S. T., Dueck, G., Mutawe, M. M., Schaafsma, D., Unruh, H., Gerthoffer, W. T., Zaagsma, J., Meurs, H., Halayko, A. J. (2011). Caveolin-1 is required for contractile phenotype expression by airway smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(11), 2430–42.

Gosens, R., Stelmack, G. L., Dueck, G., Mutawe, M. M., Hinton, M., McNeill, K. D., Paulson, A., Dakshinamurti, S., Gerthoffer, W. T., Thliveris, J. A., Unruh, H., Zaagsma, J., Halayko, A. J. (2007). Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization and contraction in airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(6), L1406–L1418.

Gupta, R., Toufaily, C., & Annabi, B. (2014). Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie*, 107, 188–202.

Gvaramia, D., Blaauboer, M. E., Hanemaaijer, R., & Everts, V. (2013). Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 32(6), 307–15.

Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 177–186.

Hirota, J. a, Nguyen, T. T. B., Schaafsma, D., Sharma, P., & Tran, T. (2009). Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22(5), 370–8.

Holgate, S. T. (2010). A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2(3), 165–71.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (2010). <http://www.iner.salud.gob.mx/>

Kim, H. Y., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 11(7), 577–84.

Kovtun, O., Tillu, V. a., Ariotti, N., Parton, R. G., & Collins, B. M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *Journal of Cell Science*, 128(7),

- Maniatis, N. A., Chernaya, O., Shinin, V., & Minshall, R. D. (2012). Caveolins and lung function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 729, 157–79.
- McPhee, S. J., Lingappa, V. R., & Ganong, W. F. (2003). *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*. México: Manual Moderno.
- Mohan, J., Moren, B., Larsson, E., Holst, M. R., & Lundmark, R. (2015). Cavin3 interacts with cavin1 and caveolin1 to increase surface dynamics of caveolae. *Journal of Cell Science*, 128(5), 979–991.
- Moore, K. L., & Dalley, A. F. (2002). *Anatomía con orientación clínica* (4ª ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2009). *Inmunobiología de Janeway* (7ª ed.) México: McGrawHill Interamericana
- Nabi, I. R. (2009). Cavin fever: regulating caveolae. *Nature Cell Biology*, 11(7), 789–791.
- Parton, R. G., & del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 98–112.
- Prakash, Y., & Thompson, M. (2007). Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(5), L1118–1126.
- Rackley, C. R., & Stripp, B. R. (2012). Building and maintaining the epithelium of the lung. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2724–2730.
- Razani, B., & Lisanti, M. (2002). The Role of Caveolae and the Caveolins in Mammalian Physiology. *Rice Undergraduate Science Review (The Catalyst)*, 1, 44–50.
- Razani, B., Woodman, S. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, 54(3), 431–67.
- Roa, J., Bermúdez, M., & Acero, R. (2000). *Neumología*. Colombia: McGrawHill Interamericana.
- Rojas R., C. (2004). Epidemiología del asma. In *Asma bronquial* (2ª ed., pp. 32–44). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- Siddiqui, S., Redhu, N. S., Ojo, O. O., Liu, B., Irechukwu, N., Billington, C., ... Moir, L. M. (2013). Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 132–44.
- Vargas B., M. (2009a). Epidemiología del asma. *Neumología Y Cirugía de Tórax*, 68, 91–97.

Vargas B., M. (2009b). Fisiopatología del asma. *New.medigraphic.com*, 68, 111–115.

Welsch, U. (2008). *Sobotta. Histología* (2ª ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Wright, D. B., Sharma, P., Ryu, M., Rissé, P., Ngo, M., Maarsingh, H., Koziol-White, C., Jha, A., Halayko, A. J., West, A. R. (2013). Models to study airway smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: implications in understanding asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 24–36.

Wright, D. B., Trian, T., Siddiqui, S., Pascoe, C. ., Ojo, O. O., Johnson, J. R., Dekkers, B. G. J., Dakshinamurti, S., Bagchi, R., Burgess, J. K., Kanabar, V. (2013). Pulmonary Pharmacology & Therapeutics Functional phenotype of airway myocytes from asthmatic airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 95–104.

Wright, D. B., Tripathi, S., Sikarwar, A., Santosh, K. T., Perez-Zoghbi, J., Ojo, O. O., Irechukwu, N., Ward, J. P. T., Schaafsma, D. (2013). Regulation of GPCR-mediated smooth muscle contraction: implications for asthma and pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 121–31.

Xia, Y. C., Redhu, N. S., Moir, L. M., Koziol-White, C., Ammit, A. J., Al-Alwan, L., Camoretti-Mercado, B., Clifford, R. L. (2013). Pro-inflammatory and immunomodulatory functions of airway smooth muscle: emerging concepts. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 64–74.

Zhu, L., Cui, Y., Chang, Y., & Fang, F. (2010). A Second Protein Marker of Caveolae: Caveolin-2. *Chinese Medical Sciences Journal*, 25(2), 119–124.