



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**NIVELES DE INTEGRINAS EN CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN ASMA**  
**BRONQUIAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TÉLLEZ JIMÉNEZ OLIVIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**NIVELES DE INTEGRINAS EN CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN ASMA**  
**BRONQUIAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TÉLLEZ JIMÉNEZ OLIVIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2017.**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **TÉLLEZ JIMÉNEZ OLIVIA** con número de cuenta **303298108**, con la tesis titulada **"NIVELES DE INTEGRINAS EN CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN ASMA BRONQUIAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**:

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
Vocal: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO  
Secretario: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL  
Suplente: DR. DAVID GARCADIIEGO CÁZARES  
Suplente: M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de abril de 2017

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme continuar con mi formación académica.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca de Maestría con el número de CVU 631518, y el financiamiento otorgado en la Convocatoria de Investigación Científica Básica 2015, No. 256197.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y al M. en C. Erasmo Martínez Cordero y a la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins, tutora principal de este proyecto de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

Quiero agradecer a toda mi familia, maestros y amigos por confiar en mí siempre, enseñarme e impulsarme a ser mejor cada día.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por enseñarme no sólo a seguir una carrera profesional, sino a edificar mi vida.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias donde he llevado acabo muchos sueños entre ellos mi tesis de Licenciatura y de Maestría.

Finalmente agradezco a los miembros de mi jurado, la Dra. Lourdes Segura Valdez, la Dra. Blanca Ortiz Quintero, Dra. Norma Bobadilla Sandoval, al M. en C. Erasmo Martínez Cordero y al Dr. David Garcíadiego Cázares por sus valiosos comentarios y aportaciones para culminar este proyecto de investigación.

# ÍNDICE

<b>Índice de figuras</b>	i
<b>Índice de tablas</b>	ii
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>1. Introducción</b>	5
1.1 Vías aéreas	5
1.2 Asma	5
1.2.1 Definición	6
1.2.2 Etiología	6
1.2.3 Epidemiología	6
1.2.4 Clasificación	7
1.2.5 Diagnóstico de asma	8
1.2.6 Crisis de asma	9
1.3 Hiperreactividad	10
1.4 Bronco-obstrucción	11
1.5 Remodelación de las vías aéreas	12
1.6 Integrinas	13
1.6.1 Características estructurales de integrinas	14
1.6.2 Integrina $\alpha1\beta1$	16
1.6.3 Integrina $\alpha2\beta1$	17
1.6.4 Subunidad de integrina $\beta1$	18
1.6.5 Subunidad de integrina $\beta2$	19
1.6.6 Corte proteolítico del dominio extracelular de integrinas	21
1.7 Metaloproteasas	22
1.7.1 MMP2 y MMP9	24
<b>2. Planteamiento del problema</b>	25
<b>3. Justificación</b>	26
<b>4. Hipótesis</b>	27
<b>5. Objetivos</b>	27
<b>6. Metodología</b>	28
6.1 Grupo de estudio	28
6.2 Detección de los niveles de integrinas y colágena I en suero de pacientes	

con asma y voluntarios sanos	29
6.3 Western Blot	30
6.4. Zimografía en geles de gelatina	30
6.5. Análisis estadístico	31
<b>7. Resultados</b>	<b>32</b>
7.1 Características generales de los pacientes con asma y los controles sanos incorporados en el estudio	32
7.2 Niveles de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ y la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina en el suero de pacientes con asma	33
7.3 Niveles de colágena I en suero de pacientes con asma	38
7.4 Relación entre el FEV1 y los niveles de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ y las subunidades de integrina $\beta 1$ y $\beta 2$	39
7.5 Detección de las MMP2 y MMP9 en suero de controles sanos y en los grupos de pacientes con asma	40
7.6 Actividad de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 en suero de controles sanos y en los grupos de pacientes con asma	42
7.7 Relación entre las metaloproteasas y los niveles de integrinas en suero de pacientes con asma	43
7.8 Resumen de los resultados	45
<b>8. Discusión</b>	<b>46</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>10. Perspectivas</b>	<b>54</b>
<b>11. Literatura citada</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura esquemática de la pared de las vías aéreas.	5
<b>Figura 2.</b> Clasificación de Integrinas.	14
<b>Figura 3.</b> A) Estructura general de integrinas y B) Representación de la disposición de los dominios en una integrina que contiene el dominio I.	15
<b>Figura 4.</b> Expresión de integrinas en células inflamatorias y células estructurales de las vías aéreas.	21
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de los dominios de MMPs.	23
<b>Figura 6.</b> Estructura esquemática de una MMP.	23
<b>Figura 7.</b> A) Niveles de la integrina $\alpha 1\beta 1$ en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma. B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ .	34
<b>Figura 8.</b> A) Niveles de la integrina $\alpha 2\beta 1$ en suero de controles sanos y pacientes sin crisis de asma y con crisis de asma. B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$ .	35
<b>Figura 9.</b> A) Niveles de la subunidad $\beta 1$ de integrina en suero de controles sanos y pacientes sin crisis de asma y con crisis de asma. B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$ .	36
<b>Figura 10.</b> A) Niveles de la subunidad $\beta 2$ de integrina en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma. B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la subunidad $\beta 2$ de integrina.	37
<b>Figura 11.</b> Determinación de los niveles de colágena I en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma.	38
<b>Figura 12.</b> Western blot representativo y densitometría de la expresión de la metaloproteasa MMP2.	41
<b>Figura 13.</b> Western blot representativo y densitometría de la expresión de la metaloproteasa MMP9.	41
<b>Figura 14.</b> Zimograma de gelatina de sueros de controles sanos y pacientes sin crisis (A) de asma y con crisis de asma (B).	41
<b>Figura 15.</b> Densitometría de las bandas con actividad gelatinolítica de la forma activa MMP2 (A) y la forma latente (97 kDa) y activa (75 kDa) de la MMP9 (B) en sueros de controles sanos y pacientes de asma.	43
<b>Figura 16.</b> Esquema representativo de los resultados obtenidos en este estudio.	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del asma por gravedad.	8
<b>Tabla 2.</b> Características utilizadas para establecer el diagnóstico de asma.	9
<b>Tabla 3.</b> Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	28
<b>Tabla 4.</b> Características generales de los grupos incluidos en el estudio.	32
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas y el FEV1.	39
<b>Tabla 6.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas, colágena I y las subunidades de integrinas.	40
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas y las MMP2 y MMP9.	44
<b>Tabla 8.</b> Resumen de las correlaciones.	45

## RESUMEN

El asma se caracteriza por inflamación crónica de las vías aéreas y bronco-obstrucción reversible. Los pacientes con crisis recurrentes de asma presentan un estrechamiento progresivo de las vías aéreas por inflamación y/o remodelación. En el asma los componentes de la matriz extracelular en las vías aéreas se modifican. Las integrinas son las principales moléculas que median la interacción entre los componentes de la matriz extracelular y las células estructurales de las vías aéreas y participan durante el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas. Sin embargo, poco se sabe acerca del papel de las integrinas en el asma. En un estudio previo de nuestro laboratorio observamos que los ectodominios de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  se acumulan en áreas acelulares de la pared de las vías aéreas en un modelo crónico de asma en el cobayo, también encontramos que, estas integrinas y las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  de integrinas se pueden detectar en el suero y el lavado bronco-alveolar. Los dominios extracelulares de algunas proteínas pueden ser cortados proteolíticamente para liberarse de las células. Se ha descrito que los receptores solubles son liberados de las células por corte proteolítico de sus dominios extracelulares, fenómeno conocido como *-shedding*”, mediante metaloproteasas. Por ejemplo, se ha encontrado a las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha\text{M}\beta2$  solubles en fluidos corporales de humanos en condiciones normales y de inflamación. Adicionalmente, se ha observado que la metaloproteasa 2 y 9 (MMP2 y MMP9) cortan los ectodominios de las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  de integrinas, respectivamente. Ignoramos si los niveles de integrinas en circulación sanguínea aumentan en los pacientes con crisis de asma. Por lo que, en este estudio se evaluaron mediante ELISA los niveles de las integrinas  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ , así como, las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  de integrina en suero de pacientes con y sin crisis de asma, simultáneamente se detectaron los niveles de colágena I, uno de los ligandos de estas integrinas y se analizó la presencia y actividad de la MMP2 y la MMP9 en el suero de estos mismos pacientes mediante Western blot y zimografía.

Nuestros resultados mostraron que los niveles de la integrina  $\alpha1\beta1$  en suero de pacientes con crisis de asma disminuyen, mientras que los niveles de la integrina  $\alpha2\beta1$  y la subunidad  $\beta2$  de integrina aumentaron durante la crisis de asma. Los niveles de la subunidad  $\beta1$  de integrina y de colágena I permanecieron sin cambios. Sin embargo, los niveles de colágena I se asociaron de forma directa con los niveles de la integrina  $\alpha2\beta1$ . Por otro lado, el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) se asoció de

manera directa con los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  y de forma inversa con los niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades de integrina  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en suero de los pacientes.

La MMP2 y la MMP9 no mostraron cambios significativos entre los grupos. Sin embargo, la actividad de la MMP9 en suero de los pacientes con crisis de asma aumentó. La MMP9 latente y activa se asoció directamente con los niveles de la subunidad  $\beta 2$  de integrina. Esta misma proteasa en su forma latente se asoció de manera inversa con la integrina  $\alpha 1\beta 1$ . Mientras que la MMP2 se asoció de manera directa con la integrina  $\alpha 1\beta 1$ .

Estos resultados sugieren que los niveles inversos de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  pueden tener un papel en la regulación de la síntesis y degradación de colágena I en el asma. Durante la crisis de asma los dominios extracelulares de las integrinas  $\beta 2$  probablemente son liberados por *-shedding* mediante la MMP9 como un mecanismo de regulación de estas integrinas con sus ligandos. Diferentes niveles de integrinas solubles pueden ser encontrados durante las crisis de asma, lo que sugiere la importancia de estas integrinas en el desarrollo de exacerbaciones de asma y la disminución en la función pulmonar.

## **ABSTRACT**

Asthma is characterized by chronic airway inflammation and reversible broncho-obstruction. The patients with recurrent asthma exacerbations have a progressive narrowing of the airways by inflammation and/or remodeling. The extracellular matrix components are modified in asthma. Integrins are the major molecules that mediate the interaction between the components of the extracellular matrix and the structural cells of the airways and they participate during the recruitment of inflammatory cells into the airways. However, little is known about the role of integrins in asthma. In a previous study of our laboratory we observed that the ectodomains of  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins accumulate in acellular areas of the airway wall in a chronic model of asthma in the guinea pig, we also find that these integrins and  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrin subunits can be detected in serum and bronchoalveolar lavage. The extracellular domains of some membrane proteins can be cleaved proteolytically to be released from the cells. It has been reported that soluble receptors are released from cells by proteolytic cleavage of their extracellular domains, a phenomenon known as shedding, by metalloproteases. For example,  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha M\beta 2$  integrins have been found like soluble forms in human body fluids in normal and inflammatory conditions. Additionally, it has been observed that metalloproteases 2 and 9 (MMP2 and MMP9) cleave the ectodomains of the  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrin subunits, respectively. Therefore, in this study, the levels of the  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  integrins, as well as  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrin subunits in serum of patients with and without asthma exacerbations were evaluated by ELISA, simultaneously the levels of collagen I, one of the ligands of these integrins, and the presence and activity of MMP2 and MMP9 in the serum of these same patients were analyzed by Western blot and zymography.

Our results showed that levels of  $\alpha 1\beta 1$  integrin in serum of the patients with asthma exacerbations decrease, while the levels of  $\alpha 2\beta 1$  integrin and  $\beta 2$  integrin subunit increase during the asthma exacerbations. The levels of  $\beta 1$  integrin subunit and collagen I remained unchanged. However, collagen I levels were directly associated with  $\alpha 2\beta 1$  integrin levels. On the other hand, forced expiratory volume in the first second (FEV1) was directly associated with  $\alpha 1\beta 1$  integrin levels and inversely with  $\alpha 2\beta 1$  integrin levels and  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrin subunits in serum of the patients.

MMP2 and MMP9 did not show significant changes between groups. However, the activity of MMP9 in serum of patients with asthma exacerbations increased. Latent and active

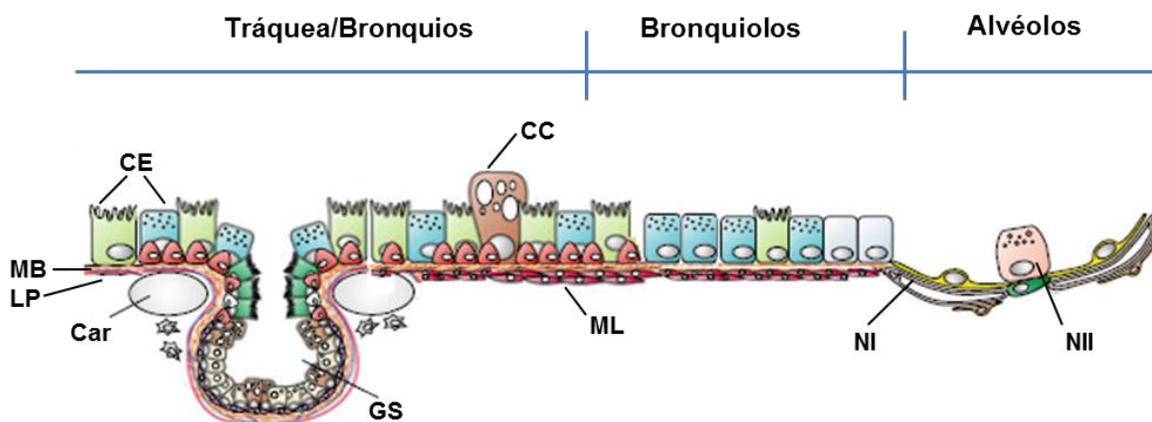
MMP9 was directly associated with  $\beta 2$  integrin subunit levels. This same protease in its latent form was inversely associated with  $\alpha 1\beta 1$  integrin. While MMP2 was directly associated with the integrin  $\alpha 1\beta 1$ .

These results suggest that the inverse levels of  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins may play a role in the regulation of collagen synthesis and degradation in asthma. The extracellular domains of  $\beta 2$  integrins are probably released during asthma exacerbations by shedding through MMP9 as a regulatory mechanism of these integrins with its ligands. Different levels of soluble integrins can be found during asthma exacerbation, suggesting the importance of these integrins in the development of asthma exacerbations and decreased lung function.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Vías aéreas

Las vías aéreas constituyen la parte conductora del sistema respiratorio y estructuralmente se dividen en vías aéreas superiores e inferiores. Las superiores están formadas por las fosas nasales, la cavidad oral y la faringe. Mientras que las vías aéreas inferiores están formadas por la laringe, la tráquea, los bronquios y bronquiolos (Tortora GJ, 2012). La pared de las vías aéreas inferiores consiste en una capa mucosa, una capa de músculo liso y una capa fibrosa (Ochs M, 2008; Fortoul T, 2013). La capa mucosa está constituida por el epitelio, la membrana basal y la lámina propia. La capa de músculo liso disminuye conforme las vías aéreas reducen su calibre y desaparece en los alvéolos. La capa fibrosa está formada por cartílago cubierto de la adventicia y sólo se encuentra en la tráquea y los bronquios (Fortoul, 2013) (Figura 1).



**Figura 1. Estructura esquemática de la pared de las vías aéreas.** Células epiteliales (CE), membrana basal (MB), lamina propia (LM), cartílago (Car), glándula submucosa (GS), célula caliciforme (CC), músculo liso (ML), neumocito tipo I (NI), neumocito tipo II (NII). Modificado de Volckaert T. 2014.

Las vías aéreas tienen la función de filtrar, calentar, humedecer y conducir el aire hacia los alvéolos, además de eliminar los vapores hidrosolubles, el polvo y las bacterias (Tortora GJ, 2012). Diversas enfermedades se asocian a desordenes estructurales y funcionales de las vías aéreas, entre ellas se encuentra el asma.

## **1.2 Asma**

### **1.2.1 Definición**

El asma es una enfermedad heterogénea que generalmente se caracteriza por inflamación crónica de las vías aéreas. Se define por la historia de síntomas respiratorios como sibilancias, disnea, dificultad para respirar, opresión torácica y tos que varían con el tiempo y se acompañan de una limitación variable del flujo de aire espiratorio (GINA, 2016).

### **1.2.2 Etiología**

Los factores que influyen en el desarrollo del asma se clasifican en factores asociados al huésped y factores ambientales (GINA, 2016; Kim HY, 2010). La predisposición genética es uno de los factores asociados al individuo. En la patogénesis del asma se describen alteraciones en la expresión de numerosos genes. Algunos de éstos resultan en el incremento de los niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica para antígenos inocuos del medio ambiente (alérgenos), fenómeno conocido como atopia (Bousquet J 2000). La alteración de otros genes induce la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, lo que contribuye a la disfunción de las vías aéreas. Otros factores asociados al huésped son el género y la obesidad (GINA, 2016). Entre los factores ambientales que favorecen el desarrollo del asma se encuentran los alérgenos provenientes de animales, las esporas de hongos, las infecciones virales, el ejercicio físico, la contaminación, la dieta y algunos fármacos. Ambos factores, genéticos y ambientales interactúan en la propensión a desarrollar asma (GINA, 2016; García-Marcos, 2004).

### **1.2.3 Epidemiología**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen 235 millones de pacientes con asma en el mundo y es la enfermedad crónica más frecuente en niños (OMS, 2016). La prevalencia del asma es mayor en países desarrollados, que en países con bajos ingresos económicos y la tendencia de su prevalencia sigue un gradiente urbano-rural (Holgate ST, 2015). Sin embargo, más del 80% de las muertes por complicaciones del asma se presentan en países con bajos ingresos económicos (OMS, 2016).

En México la prevalencia del asma es variable entre los estados. Por ejemplo, en la Ciudad de México la prevalencia es del 5%, mientras que, en Yucatán es del 12%. La variabilidad en la frecuencia del asma se correlaciona de forma inversa con la altitud de la región y de forma directa con su temperatura (Vargas-Becerra, 2009a). La variabilidad en la prevalencia del asma en niños es aún mayor y oscila entre el 8 y 20% (GPC, 2009).

Durante el año 2006, en el Instituto Mexicano del Seguro Social se realizaron más de 600,000 consultas por asma y 270,000 de los casos requirieron atención hospitalaria (GPC, 2009). La atención médica de esta enfermedad representa una carga socioeconómica elevada, ya que genera costos directos (gastos médicos) e indirectos (ausentismo laboral y escolar) (GPC, 2009). Adicionalmente, el asma genera repercusiones afectivas y sociales que afectan la calidad de vida de los pacientes (GINA, 2016).

#### **1.2.4 Clasificación del asma**

El asma es un desorden con múltiples fenotipos por lo que se han propuesto diferentes esquemas para su clasificación y con esto mejorar el tratamiento clínico (King CS, 2008; GINA, 2016).

En función de la frecuencia de los síntomas el asma se clasifica en episódica, persistente, estacional, nocturna o matutina. La clasificación según el control del asma se divide en controlada y no controlada, esta clasificación tiene como criterio la calidad de vida del paciente y la cantidad de medicamento que se requiere para su control (GINA, 2016; Salas H, 2009).

De acuerdo con su etiología, el asma se clasifica en alérgica o extrínseca y en no alérgica o intrínseca (Vargas-Becerra, 2005). El asma alérgica se origina por una reacción de hipersensibilidad de tipo I y los síntomas se presentan como resultado de la exposición a algunos alérgenos. En el asma no alérgica los síntomas no se asocian a la exposición de alérgenos y los pacientes reaccionan a un variado número de estímulos como al aire frío o seco, el exceso de humedad, el ejercicio físico, o las infecciones y se sugiere que es una forma de autoinmunidad (Graham L, 2006). El asma alérgica y no alérgica son clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similares. Por ejemplo, en ambos tipos de asma

existe una infiltración de linfocitos T cooperadores de la clase 2 (Th2) (Th, por sus siglas en inglés, *T helper*), eosinófilos y mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas. La forma más frecuente es el asma alérgica y en algunos pacientes pueden coexistir ambas formas (Humbert M, 1999; King CS, 2008).

La clasificación por gravedad del asma, es la forma más utilizada de clasificar a la enfermedad, ésta considera la frecuencia de los síntomas, el porcentaje del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1, por sus siglas en inglés, *forced expiratory volumen in 1 second*) y el uso de agonistas  $\beta$ 2 adrenérgicos. Según la gravedad el asma se clasifica como intermitente o persistente, esta última puede ser leve, moderada o grave (GINA, 2016; Graham L, 2006) Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación del asma por gravedad**

	<b>Síntomas por las mañanas</b>	<b>Síntomas por las noches</b>	<b>Exacerbaciones</b>	<b>FEV1</b>	<b>Variabilidad del FEV1</b>	<b>Uso de agonistas <math>\beta</math>2 adrenérgicos</b>
<b>Intermitente</b>	< 1 vez por semana	< 2 por mes	Breves	> 80 % del predicho	< 20%	
<b>Persistente leve</b>	> 1 vez por semana pero < 1 vez al día	> 2 por mes	Pueden afectar la actividad y el sueño	> 80 % del predicho	20-30%	
<b>Persistente moderada</b>	Diario	> 1 vez por semana	Pueden afectar la actividad y el sueño	60-80 % del predicho	>30%	Diario
<b>Persistente grave</b>	Diario	Frecuentes	Limitación de actividades	$\leq$ 60 % del predicho	>30%	

### 1.2.5 Diagnóstico de asma

El diagnóstico de asma se basa fundamentalmente en la clínica, son de utilidad para el diagnóstico los antecedentes de los síntomas respiratorios variables, la historia familiar de asma y los síntomas episódicos después de la exposición con algún alérgeno (Holgate ST, 2015; GINA, 2016). Adicionalmente, es preciso realizar una evaluación de la función

pulmonar para confirmar la sospecha clínica de asma, para este propósito la espirometría es la técnica más utilizada ya que puede evidenciar la limitación variable del flujo de aire espiratorio. En la tabla 2 se observan los criterios utilizados para el diagnóstico de asma.

**Tabla 2. Características utilizadas para establecer el diagnóstico de asma (GINA, 2016)**

<p>I. Antecedentes de síntomas respiratorios</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los síntomas típicos son sibilancias, dificultad respiratoria, opresión torácica y tos.</li> <li>• En general las personas asmáticas manifiestan más de uno de estos síntomas.</li> <li>• Los síntomas aparecen de forma variable a lo largo del tiempo y varían en intensidad.</li> <li>• Los síntomas aparecen o empeoran con frecuencia por la noche o al despertarse.</li> <li>• Los síntomas suelen ser desencadenados por el ejercicio, los alérgenos, la risa o el aire frío.</li> <li>• Los síntomas aparecen o se agravan con frecuencia con las infecciones víricas.</li> </ul>
<p>II. Evidencia indicativa de una limitación variable del flujo de aire espiratorio</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Al menos una vez en el proceso diagnóstico cuando el FEV1 es bajo, se documenta que el cociente FEV1/FVC está reducido. El cociente FEV1/FVC normalmente es mayor de 0.75-0.80 en adultos y de 0.90 en niños.</li> <li>• Aumento del FEV1 en más de un 12% (&gt;200 ml) luego de la inhalación de un broncodilatador, lo que se denomina reversibilidad con broncodilatador e indica reversibilidad a la limitación del flujo de aire.</li> <li>• Puede no darse reversibilidad con broncodilatadores durante las crisis o exacerbaciones y durante las infecciones víricas. En este caso, cuando se evalúa por primera vez el siguiente paso depende de la urgencia clínica y la disponibilidad de otras pruebas.</li> </ul>

### 1.2.6 Crisis de asma

Una crisis o exacerbación de asma es el agravamiento de los síntomas y la función pulmonar respecto al estado habitual del paciente. Ocasionalmente puede ser la forma de presentación inicial del asma (GINA, 2016). Todos los pacientes con asma tienen el riesgo de desarrollar exacerbaciones o crisis caracterizadas por dificultad respiratoria, tos, sibilancias y disminución de la función pulmonar. Los pacientes con crisis recurrentes de

asma presentan un estrechamiento progresivo de las vías aéreas por inflamación y/o remodelación (Jiménez G, 2009). Se sabe que durante las crisis de asma existe un aumento en el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas (Baek JK, 2013). Los mediadores que liberan estas células provocan la contracción del músculo liso bronquial, secreción de moco, vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular que contribuyen al agravamiento de los síntomas de la enfermedad (Galli S, 2008).

La evaluación de cualquier exacerbación de asma debe incluir la identificación de signos y antecedentes de crisis de riesgo vital y la utilización de medidas objetivas para cuantificar el grado de obstrucción al flujo aéreo. La valoración objetiva del grado de obstrucción al flujo aéreo mediante espirometría (FEV1) o con medidor de flujo espiratorio máximo (PEF, por sus siglas en inglés, *peak flow*) ha demostrado determinar la gravedad inicial y evaluar la respuesta al tratamiento. En función de los valores obtenidos se considera exacerbación: leve, si el FEV1 o PEF es igual o superior al 70% de su valor teórico o mejor valor personal previo respectivamente; moderada, si el FEV1 o el PEF están entre el 70 y el 50%, y grave, si estos valores son inferiores al 50% (GPC, 2017).

La severidad de la crisis de asma determina el tratamiento. En general el tratamiento en las crisis moderadas requiere dosis altas de agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos como bronco-dilatador. En crisis casi fatal se debe mantener una oxigenación arterial con oxígeno suplementario (Jiménez G, 2009).

Las crisis de asma representan la principal causa de muerte en pacientes con asma severa a nivel mundial y un incremento de los costos en el sistema para el cuidado de la salud (Lane S, 2006). Si no se resuelve la obstrucción de las vías aéreas, se puede provocar una insuficiencia respiratoria como consecuencia de la disfunción en la relación ventilación/perfusión, el deficiente intercambio gaseoso y el agotamiento muscular (Jiménez G, 2009).

### **1.3 Hiperreactividad**

El asma suele asociarse con hiperreactividad e inflamación de las vías respiratorias, pero éstas no son necesarias ni suficientes para hacer el diagnóstico (GINA, 2016). La hiperreactividad es el estado en el que las vías aéreas disminuyen excesivamente su

calibre ante estímulos que en sujetos sanos causaría poco o ningún efecto. Esta disminución se debe al incremento en la sensibilidad del músculo liso de las vías aéreas a agonistas que estimulan su contracción (Vargas-Becerra 2005; GINA, 2016). La hiperreactividad es una característica clínica común del asma y frecuentemente proporcional a la gravedad de la enfermedad (O' Byrne P, 2003; Cockcroft D, 2006).

Los factores que contribuyen a la hiperreactividad de las vías aéreas se dividen en variables y persistentes. Los factores variables se asocian al proceso inflamatorio y pueden ser influenciados por factores ambientales como la exposición a alérgenos e infecciones respiratorias. Los factores persistentes resultan de los cambios en la estructura de las vías aéreas como efecto del proceso de remodelación. Ambos factores inducen la obstrucción del flujo de aire (Busse WW, 2010).

La hiperreactividad se evalúa mediante la administración de concentraciones crecientes de un agente bronco-constrictor, como histamina o metacolina, que inducen la contracción del músculo liso. Esta se evalúa por medio de la dosis provocativa 20, que se refiere a la concentración del agente que induce la disminución del 20% de la función pulmonar medido mediante el FEV1. En sujetos sanos se requieren concentraciones elevadas del agente para inducir la disminución del 20% del FEV1, mientras que en sujetos con asma esta disminución se alcanza con concentraciones menores (O' Byrne P, 2003; GINA 2016).

#### **1.4 Bronco-obstrucción**

La obstrucción del flujo de aire es la alteración funcional básica en el asma y se asocia a la disminución del calibre de las vías aéreas, especialmente durante la espiración. La bronco-obstrucción da lugar a la crisis o exacerbación asmática que puede ocurrir en cualquier nivel del árbol traqueo-bronquial; sin embargo, las vías aéreas periféricas, son el principal sitio de obstrucción (Burgel PR, 2009; Vargas-Becerra, 2009b).

La obstrucción de las vías aéreas se detecta mediante pruebas de función respiratoria que evalúan diferentes parámetros, las pruebas más utilizadas son la flujometría y la espirometría, esta última analiza la totalidad de espiración forzada durante mínimo 6 segundos. Uno de los parámetros para determinar la función pulmonar es el FEV1, el cual

evalúa el volumen máximo de aire espirado en el primer segundo. La disminución de este parámetro indica una limitación del flujo de aire (Vargas-Becerra 2009b; GINA, 2016).

Los principales factores que originan la disminución del calibre de las vías aéreas son la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, la formación de edema y el engrosamiento de la pared traqueo-bronquial (Vargas-Becerra, 2009b). En el asma la obstrucción del flujo de aire suele ser episódica y generalmente es reversible de manera espontánea o con tratamiento. Sin embargo, en algunos pacientes con asma persistente la obstrucción se vuelve progresiva e irreversible como resultado de la inflamación crónica y/o la remodelación de las vías aéreas (Yamauchi K, 2007; GINA, 2016).

### **1.5 Remodelación de las vías aéreas**

La remodelación de las vías aéreas se refiere a los cambios en la composición, organización y cantidad de los elementos estructurales de las vías aéreas ocasionados por ciclos repetidos de daño y reparación (Bergeron C, 2010; Manuyakorn W 2013; Hirota N, 2013). La remodelación de las vías aérea generalmente se ha considerado como resultado de la inflamación crónica. Sin embargo, se ha sugerido que el estrés mecánico de la propia bronco-obstrucción puede llevar a la remodelación de las vías aéreas (Hirota N, 2013). La remodelación se ha asociado con la disminución de la función pulmonar y la severidad del asma, debido al engrosamiento de la pared de las vías aéreas y a la progresiva e irreversible obstrucción del flujo de aire (Hirota N, 2013; Saglani S, 2015).

La remodelación de las vías aéreas se caracteriza por la hipertrófia e hiperplasia de células de musculo liso, alteración de células epiteliales y miofibroblastos, hiperplasia de células caliciformes, angiogénesis, engrosamiento de la membrana basal reticular y fibrosis subepitelial (Bergeron C, 2010; Fahy John V, 2015).

La fibrosis subepitelial es el engrosamiento de la membrana basal de la pared de la vías aéreas debido a la acumulación de componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena (Bazán-Perkins B, 2009; Bergeron C, 2010). La fibrosis subepitelial es el resultado de un aumento en el depósito y una disminución en la degradación de proteínas de la matriz extracelular (Bergeron C, 2010). La matriz extracelular es una estructura dinámica que provee a los tejidos de soporte estructural, organización y orientación

(Dekkers et al, 2010). Además existen numerosas proteínas asociadas a la matriz extracelular como factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular (Hynes RO, 2012).

En las vías aéreas la matriz extracelular presente en la membrana basal, está formada principalmente de lamininas, colágena IV, entactina, glicoproteínas y proteoglicanos ricos en heparán sulfato. Por debajo de la lámina reticular, la matriz extracelular está formada de colágena I, III y V, fibronectina y lamininas que se dispersa a través de toda la submucosa, alrededor de los vasos sanguíneos, las glándulas, el músculo liso y la adventicia (Fernandes DJ, 2006). Para mantener la homeostasis entre los componente de la matriz extracelular es necesario que la síntesis y degradación de estos componentes estén en equilibrio (Bousquet J, 2000; Blumbach K, 2012). Las proteínas que se encargan de degradar muchos de los componentes de la matriz extracelular son las metaloproteasas (MMPs), las cuales son reguladas por inhibidores específicos de metaloproteasas (TIMPs) (Bergeron C, 2010). Adicionalmente la expresión de receptores de colágena regula la síntesis y degradación de esta proteína (Gardner H, 2014).

En individuos con asma existe un incremento en el depósito de proteínas de la matriz extracelular en la pared de la vía aérea (Fernandes D, 2006). El depósito de colágena I y III se ha asociado con la gravedad del asma e hiperreactividad (Chetta A, 1997; Bergeron C, 2010). En pacientes con asma fatal, se ha observado un aumento en el depósito de colágena I y fibronectina alrededor del músculo liso de las vías aéreas (Araujo BB, 2008).

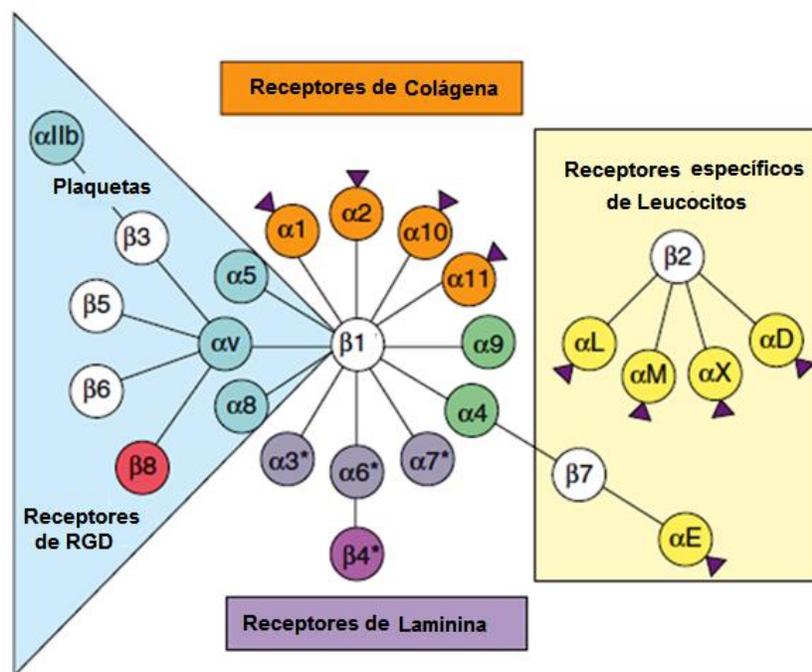
El depósito de los componentes de la matriz extracelular afecta la estructura de las vías aéreas ejerciendo diversos efectos sobre ellas. Los componentes de la matriz extracelular interactúan con las células de la pared de las vía aéreas mediante diversos receptores, entre los más importantes se encuentran la familia de las integrinas.

## **1.6 Integrinas**

Las integrinas son una familia de receptores de adhesión celular que poseen ligandos en la matriz extracelular y sobre la superficie celular (Hynes RO, 2002). Estos receptores regulan señales de la matriz extracelular con componentes del citoesqueleto y viceversa, por lo que pueden activar muchas vías de señalización intracelular (Hynes RO, 2002). Las

integrinas se expresan ampliamente en todas células nucleadas (Barczyk M, 2009). Participan en los procesos de adhesión, proliferación, polaridad, movilidad, secreción, diferenciación, apoptosis y supervivencia celular. Las integrinas y sus ligandos juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, el tráfico leucocitario, la angiogénesis, así como durante el desarrollo de procesos patológicos (Hynes RO, 2002).

Las integrinas son glicoproteínas transmembranales del tipo I, es decir, que atraviesan la membrana plasmática una sola vez. Estructuralmente están formadas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  que se unen de manera no covalente y forman un heterodímero obligado. En vertebrados se conocen 18 subunidades  $\alpha$  y 8 de  $\beta$ , las cuales pueden ensamblarse en 24 integrinas diferentes. Las integrinas pueden agruparse como receptores específicos de leucocitos, colágena, laminina y de sitios RGD (Hynes RO, 2002) (Fig. 2).

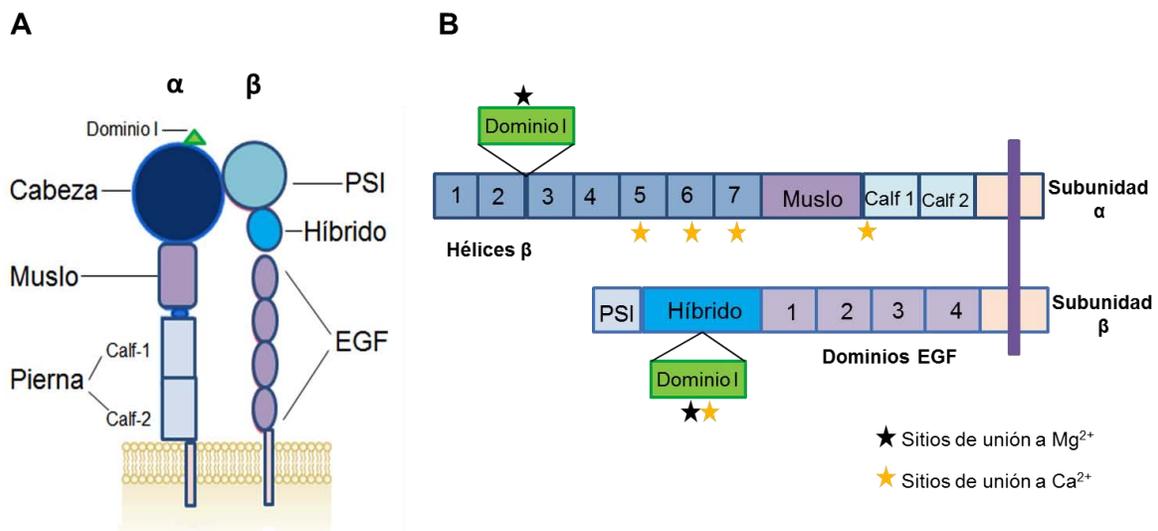


**Figura 2. Clasificación de Integrinas.** Los triángulos púrpura indican que la subunidad  $\alpha$  posee el dominio I. Modificado de Hynes RO 2002.

### 1.6.1 Características estructurales de integrinas

Las integrinas poseen un gran dominio extracelular de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos para la subunidad  $\alpha$  y de 700 residuos de aminoácidos para la subunidad  $\beta$ , un dominio transmembranal con una secuencia de 5 residuos de aminoácidos en común (GFFKR) y un dominio citoplasmático muy pequeño de 30 a 50 residuos de aminoácidos (Fig. 3A). El dominio citoplasmático carece de función enzimática y está asociado a proteínas del citoesqueleto y a proteínas de señalización intracelular, por lo que las integrinas llevan a cabo la traducción de señales por medio de proteínas como la cinasa ligada a integrina (ILK, por sus siglas en inglés, *integrin linked kinase*) y la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés, *focal adhesion kinase*) (Humpries MJ, 2000; Pan L, 2016).

La subunidad  $\alpha$  está formada por 7 hélices  $\beta$  interconectadas de manera circular, las cuales forman la "cabeza" de esta subunidad. La "cabeza" está conectada a otra estructura denominada "muslo". Ambas estructuras están sostenidas por una "pierna" que está formada por los dominios Calf-1 y Calf-2 (Fig. 3A) (Barczyk M, 2010; Liddington RC, 2014). Las últimas 4 láminas de hélices  $\beta$  contienen los dominios EF que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3B). La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos sitios afecta alostéricamente la unión al ligando (Barczyk M 2010; Johansson MW, 2013).



**Figura 3. A) Estructura general de integrinas.** Modificado de Barczyk M 2010. **B) Representación de la disposición de los dominios en una integrina que contiene el dominio I.** Modificado de Johansson MW, 2013.

Nueve de las 18 subunidades  $\alpha$  poseen un dominio I o  $\alpha I$ , el cual está presente en el subgrupo de integrinas  $\beta 1$  de unión a colágena y  $\beta 2$  específicas de leucocitos (Fig.2). Este dominio está formado por 200 residuos de aminoácidos aproximadamente, que se estructuran en 5 láminas  $\beta$  plegadas y 7  $\alpha$  hélices. El dominio  $\alpha I$  se encuentra insertado entre las láminas 2 y 3 de hélices  $\beta$  de la "cabeza" de la subunidad  $\alpha$  (Fig. 3B) (Liddington RC, 2014).

La unión al ligando ocurre mediante un enlace del ion  $Mg^{2+}$  en el sitio de adhesión dependiente del ion metálico (MIDAS, por sus siglas en inglés, *metal ion dependent adhesion site*) localizado en el dominio I. Los dominios  $\alpha I$  con la capacidad de interactuar con colágenas también poseen un dominio llamado hélice  $\alpha C$ , el cual juega un papel importante para la unión a colágena (Barczyk M, 2010).

El dominio I no es privativo de la subunidad  $\alpha$ , también está presente en la subunidad  $\beta$  donde se denomina  $\beta I$ . El dominio  $\beta I$  une un ácido aspártico cargado negativamente del ligando mediante un ion metálico de MIDAS cargado positivamente, esto ocurre únicamente en integrinas sin el dominio  $\alpha I$ , como las integrinas que se unen a lamininas y a sitios RGD (Gardner H 2014; (Liddington RC, 2014).

La subunidad  $\beta$  contiene un dominio PSI (plexina-semaforina-integrina), un dominio híbrido, el dominio  $\beta I$  y cuatro repeticiones del factor de crecimiento epidermal (EGF) ricos en cisteína (Fig.3B). El dominio  $\beta I$  además de MIDAS posee un sitio adyacente a éste (ADMIDAS, por sus siglas en inglés, *site adjacent to MIDAS*) que se une a un ion  $Ca^{2+}$  inhibitorio. El sitio ADMIDAS unido a un ion  $Mn^{2+}$  lleva a un cambio conformacional resultando en una forma activa de la integrina (Barczyk M, 2010).

Las cadenas  $\beta$  comparten homología en el región citoplasmática con motivos NPX/Y capaces de unir proteínas con dominios PTB. Proteínas como talina y kindlinas activan integrinas mediante la unión a la región citoplasmática de la subunidad  $\beta$ , mientras que filamina A regula de forma negativa esta activación (Barczyk M, 2010; Bouvard D, 2013).

### 1.6.2 Integrina $\alpha 1\beta 1$

La integrina  $\alpha 1\beta 1$  también conocida como VLA-1 (*Very late antigen 1*, por sus siglas en inglés) o CD49a/CD29. Se une principalmente a colágenas y a laminina 111, otros ligandos son matrilina 1 expresada en cartílago, galectinas 1, 3 y 8, el dominio NC1 de colágena IV y semaforina 7A sobre macrófagos. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  tiene una alta afinidad por la colágena tipo IV que por la tipo I en tejido conectivo. El dominio  $\alpha 1$  de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  puede unirse a la triple hélice de colágena en diferentes sitios con diferente afinidad. Entre estos sitios se encuentran las secuencias GLOGER, GFOGER (donde O es hidroxiprolina) y GFPGEN. El sitio de unión a colágena IV de  $\alpha 1\beta 1$  es único y de alta afinidad, donde se requiere Asp 461 en la cadena  $\alpha 1$  y Arg 461 en la cadena  $\alpha 2$  de colágena IV. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  también es un receptor de colágena IX (en cartílago) y XVI (en tejido conectivo) (Gardner H, 2014).

La integrina  $\alpha 1\beta 1$  está ampliamente expresada en mesénquima, células del sistema inmune, como monocitos, macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos B y linfocitos NK (*Natural killer*, por sus siglas en inglés), fibroblastos, músculo liso, endotelio vascular, así como en una minoría del tejido epitelial (Gardner H, 2014). En las vías aéreas de humanos sanos esta integrina se expresa en células progenitoras del músculo liso (Fernandes D. 2006). La integrina  $\alpha 1\beta 1$  se ha detectado de forma soluble en fluidos corporales de humano, como el suero y la orina de pacientes con nefropatía por inmunoglobulina A y en fluido ocular de pacientes con cataratas (Bank I, 1999, 2001; Bank J, 2008).

Entre sus funciones la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se caracteriza por ser un regulador negativo de la síntesis de colágena I por fibroblastos. La unión de  $\alpha 1\beta 1$  a su ligando induce la activación de las cinasas reguladoras de la señal extracelular 1 y 2 (Erk 1/2, por sus siglas en inglés *extracellular signal regulated kinases*) vía proteínas adaptadoras Fyn y Shc dando como resultado la reducción en la síntesis de colágena I (Pozzi A, 1998; Reunanen N, 2000). Adicionalmente  $\alpha 1\beta 1$  regula la expresión de varias MMPs. Sin embargo, parece ser un proceso más complejo y probablemente muy específico del tipo celular (Gardner H, 2014). Por otro lado, el bloqueo de la subunidad  $\alpha 1$  se asocia con la ausencia de la respuesta inducida por el alérgeno y la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de hiperreactividad en ovejas (Abraham WM, 2004).

### 1.6.3 Integrina $\alpha 2\beta 1$

La integrina  $\alpha 2\beta 1$  también conocida como VLA-2 o CD49b/CD29 tiene entre sus ligandos a las colágenas y las lamininas 111 y 332, así como, decorinas y perlecano. Entre las colágenas, la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se une con mayor afinidad a la secuencia GFOGER que se encuentra en la colágena tipo I, II y XI. La integrina  $\alpha 2\beta 1$  también se une a las colágenas III-V, XVI y a la colágena XIII transmembranal (Madamanchi A, 2014). Además de estas colágenas, el dominio  $\alpha 1$  de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  es capaz de unirse a la proteína del complemento C1q, a miembros de la familia de colectinas, como la proteína surfactante A y la lectina de unión a manosa, debido a que estas moléculas contienen segmentos de una triple hélice de colágena y su unión a estas moléculas induce la activación de células cebadas *in vitro* (Edelson BT, 2006).

La integrina  $\alpha 2\beta 1$  se expresa en células epiteliales, plaquetas, megacariocitos y fibroblastos, células NK, células cebadas, monocitos y neutrófilos. La expresión sobre linfocitos T y células endoteliales varía dependiendo de la diferenciación y del estado de activación celular (Madamanchi A, 2014). También se ha descrito su expresión en células Th17 que se adhieren a colágena tipo I y II (Boisvert M, 2007). En las vías aéreas de humanos la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se expresa en células epiteliales bronquiales (Fernandes D, 2006). Se ha descrito que esta integrina estimula la acumulación de colágena y fibronectina en las vías aéreas de pacientes con asma (Bazan-Socha S, 2012; Fernandes DJ, 2006).

Entre las funciones de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se encuentra la regulación positiva de la síntesis de colágena, mediante la activación de la proteína p38 (Ivaska J, 1999). Por lo que el efecto de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sobre la síntesis de colágena es contrario al efecto de la integrina  $\alpha 1\beta 1$ . Adicionalmente esta integrina juega un papel importante en el tráfico de células inflamatorias, la angiogénesis y el desarrollo de fibrosis (Madamanchi A, 2014).

### 1.6.4 Subunidad $\beta 1$ de Integrina

La subunidad  $\beta 1$  de integrina también conocida como CD29, puede formar heterodímeros con las subunidades  $\alpha 1$ -  $\alpha 11$  y  $\alpha v$  (Fig. 2) (Pan L 2016). Forma parte de las integrinas de unión a colágenas, lamininas y de sitios RGD como fibronectina y vitronectina. Se expresa en una amplia variedad de células como fibroblastos, células epiteliales,

basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y linfocitos T. En las vías aéreas esta subunidad asociada a  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$  se expresa en células del músculo liso, la asociación con  $\alpha 2$ , 3, 5, 6, 9 y  $\alpha v$  se observa en células epiteliales bronquiales y la asociación con las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  en células mesenquimales de las vías aéreas (Fernandes D, 2006; Pan L, 2016; Fig. 4).

El dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1$  de integrina interactúa con proteínas del citoesqueleto como  $\alpha$  actina y paxilina y con proteínas de señalización intracelular como FAK, ILK y la proteína 1 asociada al dominio citoplasmático de integrina (ICAP-1, por sus siglas en inglés, *integrin cytoplasmic domain associated protein 1*) (Pan L 2016).

Entre sus funciones la subunidad  $\beta 1$  de integrina regula la capacidad de diferenciación y proliferación del músculo liso de las vías aéreas mediante la activación por colágena I y fibronectina (Nguyen T 2005). Regula la síntesis de colágena dependiendo de su asociación con las subunidades  $\alpha 1$  o  $\alpha 2$  (Gardner H 2014) y regula el depósito de fibronectina sobre el músculo liso de las vías aéreas (Moir LM 2008). Adicionalmente una correlación entre la activación de la subunidad  $\beta 1$  de integrina de eosinófilos y la disminución en la función pulmonar ha sido observada en pacientes jóvenes-adultos con asma no severa (Johansson MW. 2012).

### **1.6.5 Subunidad de Integrina $\beta 2$**

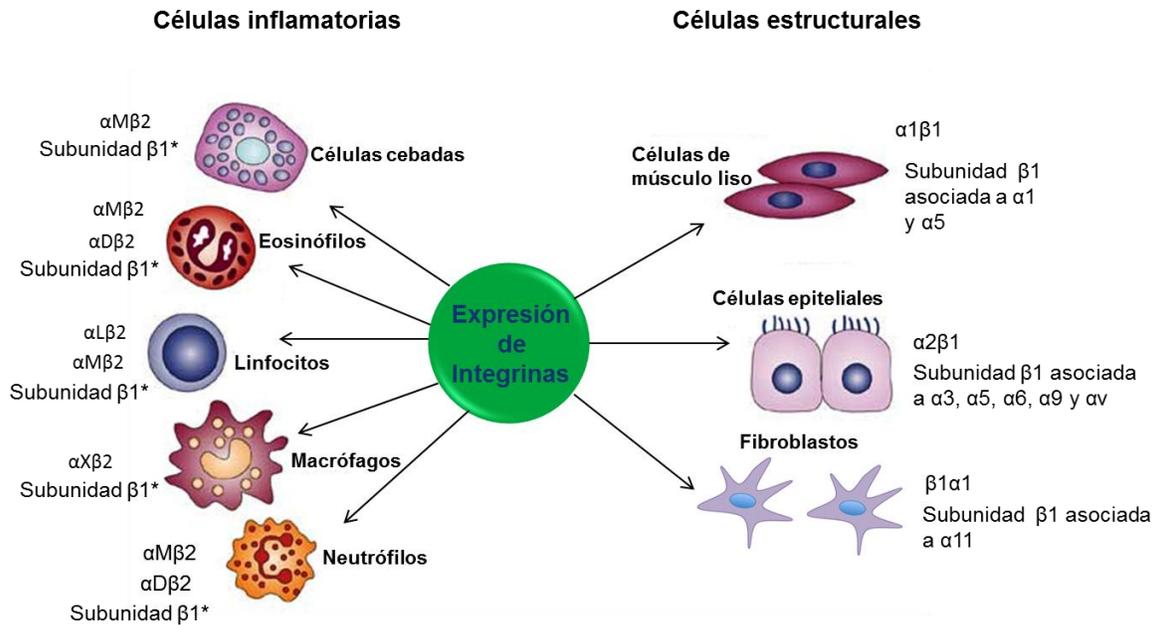
La subunidad  $\beta 2$  de integrina conocida como CD18 se asocia con 4 diferentes subunidades  $\alpha$ , formando los heterodímeros  $\alpha D\beta 2$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$  y  $\alpha X\beta 2$ . Las integrinas  $\alpha M\beta 2$  y  $\alpha X\beta 2$  son los receptores del complemento CR3 y CR4 (Brennan M, 2014). Todos estos receptores se unen por lo menos a uno de los cinco miembros de la familia de moléculas de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés, *intercellular adhesion molecules*) (Arnaout MA 2016; Pan L 2016).

La integrina  $\alpha L\beta 2$  (CD11a) se unen a toda la familia ICAM (1–5), a la molécula 1 específica de células endoteliales (ESM 1, por sus siglas en inglés, *endothelial cell-specific molecule-1*) y a la molécula 1 de adhesión de la unión (JAM 1, por sus siglas en inglés, *junctional adhesion molecule 1*). Por otro lado, la integrina  $\alpha M\beta 2$  (CD11b) es la integrina más promiscua, ya que, tiene más de 40 ligandos reportados, incluyendo, iC3b,

ICAM 1, 2, 3 y 4, fibrinógeno, fibronectina, factor X, Iba de plaquetas, JAM 3 y algunas proteasas. La integrina  $\alpha X\beta 2$  (CD11c) se une a ICAM 1 y 4, iC3b y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM 1, por sus siglas en inglés, *vascular cell adhesion molecule 1*). Finalmente, la integrina  $\alpha D\beta 2$  (CD11d) se une a ICAM 3 y a VCAM 1 y a varias proteínas de matriz extracelular (Arnaout MA, 2016).

Las integrinas  $\beta 2$  se expresan sólo sobre leucocitos pero su expresión varía entre las poblaciones de éstos. La integrina  $\alpha L\beta 2$  se expresa en todos los leucocitos pero principalmente sobre linfocitos T y B. La integrina  $\alpha M\beta 2$  se expresa predominantemente en neutrófilos, células NK, fibrocitos, células cebadas, linfocitos B, células T CD8+ y células T  $\gamma\delta$ . La integrina  $\alpha X\beta 2$  es abundante en células dendríticas mieloides, macrófagos, células dendríticas de la pulpa blanca del bazo y de la zona marginal, también se expresa en macrófagos alveolares pulmonares, células NK, linfocitos T y B. Por su parte, la integrina  $\alpha D\beta 2$  se expresa en la mayoría de los neutrófilos y monocitos en circulación sanguínea en humanos, sobre células NK, y en una pequeña fracción de células T circulantes y sobre eosinófilos en pacientes con asma (Johansson MW, 2008; Arnaout MA, 2016; Fig. 4). Adicionalmente la integrina  $\alpha M\beta 2$  se ha encontrado de forma soluble en fluidos corporales como en líquido sinovial en artritis y en suero de ratón (Gjelstrup LC, 2010; Nielsen GK, 2014).

Las integrinas que poseen la subunidad  $\beta 2$  tienen una función fundamental en la migración transendotelial de leucocitos, fagocitosis y apoptosis. Defectos en la subunidad  $\beta 2$  de integrina en humanos provoca una deficiencia en la adhesión de leucocitos, y por lo tanto la disminución de su reclutamiento hacia las zonas de infección (Arnaout MA, 2016; Pan L, 2016). En el asma los eosinófilos que portan la integrina  $\alpha M\beta 2$  activadas por IL5 o IL13 se adhieren y migran sobre periostina (Johansson MW, 2013; Fig. 4). En pacientes con asma existe un aumento en la población de neutrófilos que portan la integrina  $\alpha M\beta 2$  en comparación con el grupo control (Ciepiela O, 2013).



**Figura 4. Expresión de integrinas en células inflamatorias y células estructurales de las vías aéreas.** \*La subunidad de integrina  $\beta 1$  puede asociarse con 12 diferentes subunidades  $\alpha$ . Johansson MW, 2008; Fernandes D, 2006; Pan L, 2016.

### 1.6.6 Corte proteolítico del dominio extracelular de integrinas (“*shedding*”)

La mayoría de los estudios realizados sobre integrinas se enfocan en su expresión sobre la superficie celular y en su papel sobre la adhesión y migración. Sin embargo, se han encontrado integrinas como  $\alpha M\beta 2$  y  $\alpha 1\beta 1$  en fluidos corporales de humanos en condiciones de inflamación y en sujetos sanos (Bank I 1999, 2001; Bank J 2008; Nielsen GK, 2014). Lo que sugiere la importancia funcional de un proceso conocido como “*shedding*”, el cual se refiere al corte proteolítico del dominio extracelular de receptores de superficie, generando moléculas solubles y al mismo tiempo regulando su expresión en la superficie celular (Hayashida K, 2010; Nielsen GK, 2014).

Este proceso afecta a diversas moléculas, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, enzimas y moléculas de adhesión celular, entre otras. El corte proteolítico de los dominios extracelulares es efectuado por proteasas conocidas como *shedases*, entre ellas se encuentran la familia de desintegrinas y metaloproteasas (ADAMs, por sus siglas en inglés, a *disintegrin and metalloproteinase*) y la familia de MMPs (Arribas J 2002;

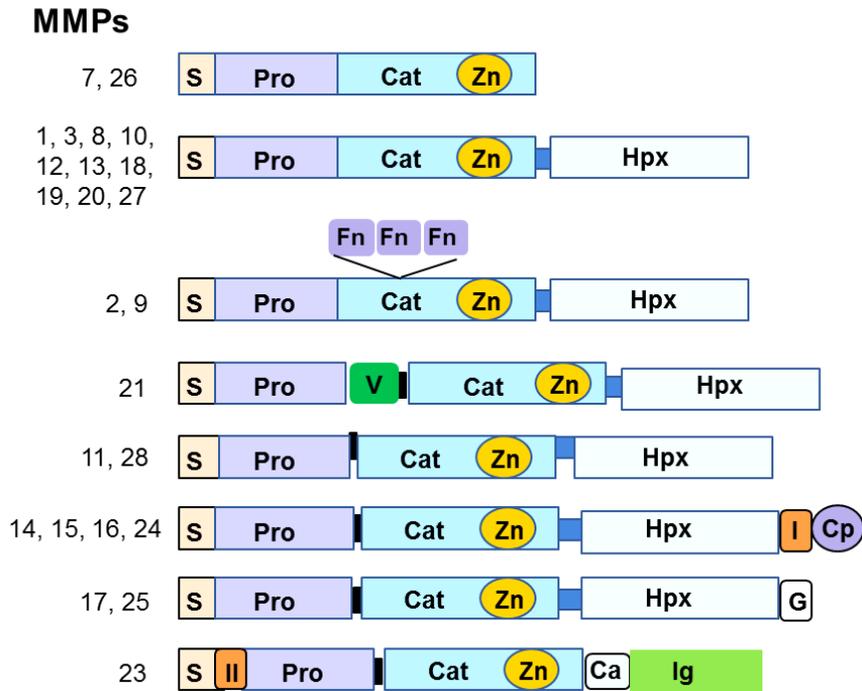
Hayashida K 2010). Se sabe que MMPs como MMP2, MMP7 y MMP9 pueden cortar dominios extracelulares de algunas integrinas como  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (von Bredow DC, 1997; Gomez IG, 2012; Kryczka J, 2012).

## 1.7 MMPs

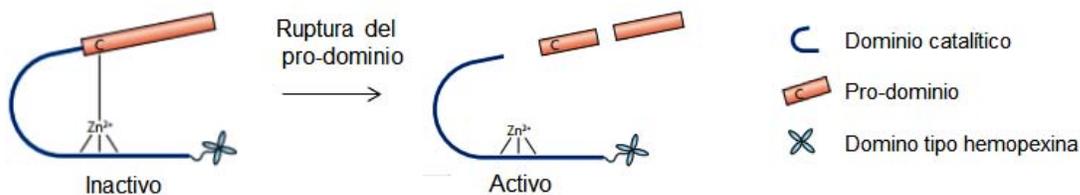
Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y del corte proteolítico del dominio extracelular de receptores de superficie (Arribas J 2002; Cauwe B. 2007). Tienen actividad sobre una gran variedad de sustratos, que incluyen otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión célula-célula y célula-MEC, así como, los receptores transmembranales (Cauwe B, 2007). Las MMPs comparten varias características funcionales incluyendo la habilidad para degradar por lo menos un componente de matriz extracelular, poseen un átomo de zinc en su sitio activo, son sintetizadas como zimógenos y su actividad es regulada por TIMPs (Page-Mc C, 2007).

La familia de las MMPs está formada por 28 miembros, casi todas las MMPs poseen dominios altamente conservados (Fig. 5). El péptido señal (PS) o pre-dominio que dirige a la proteína a la secreción extracelular. El pro-péptido o pro-dominio responsable de la latencia de las MMPs, posee un residuo de cisteína altamente conservado (PRCGVPD), el cual es responsable de estabilizar la estructura inactiva de la pro-enzima. El grupo tiol del residuo de cisteína forma un enlace coordinado con el átomo de zinc que se encuentra en el dominio catalítico manteniendo la latencia de la metaloproteasa. La activación de cualquier pro-MMP requiere el rompimiento de este enlace cisteína-zinc (Fig. 6). El dominio catalítico es el responsable de la actividad proteolítica y presenta una secuencia conservada (HEXGH). El dominio tipo hemopexina en el extremo carboxilo terminal posee de 3 a 4 secuencias repetidas similares a la proteína hemopexina y se conecta al dominio catalítico mediante una región rica en prolina denominada bisagra. El dominio tipo hemopexina y la bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato y en la interacción de la enzima con sus inhibidores (Visse R, 2003; Page-Mc C, 2007). Las MMP2 y MMP9 poseen fibronectina tipo II insertado en el sitio catalítico, la cual media la unión a colágenas. La mayoría de las MMPs son secretadas, sin embargo, 6 poseen

dominios transmembranales y se encuentran ancladas a la membrana plasmática por lo que se les denomina MMPs tipo membrana (Visse R, 2003).



**Figura 5. Representación esquemática de los dominios de MMPs.** S, péptido señal; Pro, pro-peptido; Cat, sitio catalítico; Hpx, dominio tipo hemopexina, Fn, dominios de fibronectina; V, vitronectina; I, dominio transmembranal tipo I; II, dominio transmembranal tipo II; Cp, dominio citoplásmico; G, glicofosfatidilinositol; Ig, dominio tipo IgG; Zn, zinc del sitio activo y Ca, región de arreglo de cisteína. Modificado de Visse R, 2003.



**Figura 6. Estructura esquemática de una MMP en su forma activa e inactiva.** Las MMPs son sintetizadas como zimógenos. Un residuo de cisteína conservado en el pro-dominio se enlaza con el ion zinc del dominio catalítico lo que mantiene la latencia de la metaloproteasa. La ruptura del enlace cisteína-zinc genera la forma activa de las MMPs. Modificado de Page-Mc C, 2007.

### 1.7.1 MMP2 y MMP9

MMP2 y MMP9 conocidas como gelatinasas A y B respectivamente por su capacidad de hidrolizar colágena I (gelatina). Estas enzimas también degradan otros componentes de la matriz extracelular como colágena IV, lamininas y fibronectina e hidrolizan factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular (Toth M, 2001).

MMP2 es una enzima de 72 kDa aproximadamente en su forma latente, en condiciones normales puede ser expresada por fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y macrófagos. MMP9 es una enzima que en su forma latente pesa 92 kDa y que en condiciones normales es expresada por condrocitos, neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y osteoclastos y puede ser producida como monómero u homodímero (Van den Steen, 2002; Moreland LW, 2004). Ambas enzimas son sintetizadas como zimógenos latentes (pro-MMPs) los cuales pueden ser activados por corte proteolítico o desestabilización del pro-dominio mediante la unión a su sustrato (Moreland LW, 2004). Ambas proteasas cuentan con sus inhibidores endógenos que pueden mantenerlas en latencia, TIMP-1 y 2 respectivamente (Yue J, 2012).

Las MMPs pueden interactuar con receptores de superficie celular como las integrinas para afectar múltiples vías de señalización y modular procesos celulares en estados fisiológicos y patológicos. Las MMP2 y MMP9 pueden actuar como *shedases* y cortar dominios extracelulares de integrinas (Hayashida K, 2010). La MMP9 *in vivo* corta la integrina  $\alpha 6\beta 4$  de células epiteliales de corneas de ratón (Pal-Ghosh S, 2011) esta misma proteasa corta la subunidad  $\beta 2$  de macrófagos en los residuos de aminoácidos Ala 705 e Ile 706 (Vaisar T, 2009), además regula la migración de macrófagos en los sitios de inflamación (Gomez IG, 2012). Adicionalmente la MMP2 corta el dominio extracelular de la integrina  $\beta 1$  en células de cáncer de colon (Kryczka J, 2012).

Además de esta actividad proteolítica las MMP2 y MMP9 también desempeñan un papel importante en la remodelación de las vías aéreas en el asma y durante la exacerbación o crisis de asma son secretadas tanto por células estructurales e inflamatorias de las vías aéreas (Ohbayashi H, 2005; González AG, 2016). Así mismo, altos niveles de MMP9 en suero, esputo y lavado bronco-alveolar han sido observados en pacientes con asma persistente (Naik SP, 2016).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en un modelo de asma alérgica en cobayos, se ha descrito que la inflamación pulmonar crónica se acompañó de gran acumulación de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  libres, es decir, no unidas a células. Mediante microscopía electrónica se determinó que estas integrinas solubles estaban sobre las colágenas tipo I de la lámina propia, el intersticio y la tipo IV de la membrana basal. Así mismo, por morfometría observamos que la magnitud de la expresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina libre correlacionó directamente con el grado de fibrosis e inflamación de la vía aérea (Bazán-Perkins B, 2009). Posteriormente mediante ELISA se han encontrado ciertos niveles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  y la subunidad  $\beta 2$  solubles en suero y lavado bronco-alveolar de los cobayos del modelo de asma (García-Trejo D, 2014). Así mismo, se ha evaluado la secreción de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en miocitos de las vías aéreas de cobayos de este mismo modelo de asma (Álvarez-Santos 2016).

Por otro lado, existen estudios donde se ha encontrado a las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha M\beta 2$  solubles en fluidos corporales de humanos en condiciones normales y de inflamación (Nielsen GK, 2014). Esto sugiere la importancia funcional de un proceso conocido como *-shedding*", el cual se refiere al corte proteolítico del dominio extracelular de receptores de superficie, generando moléculas solubles, el cual puede ser efectuado por diferentes proteasas (Hayashida K, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El asma es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia a nivel mundial (OMS, 2016). Así mismo, las crisis o exacerbaciones de asma representan un incremento de los costos en el sistema para el cuidado de la salud y una disminución en la calidad de vida de los pacientes (Johnston NW. 2006). Los pacientes con frecuentes crisis de asma tienen una disminución progresiva de la función pulmonar y un incremento en la bronco-obstrucción, consecuencia de la inflamación y/o la remodelación de las vías aéreas (Bai TR, 2007). En particular, la detección oportuna de la remodelación de las vías aéreas, mediante métodos no invasivos, podría evitar la disminución permanente de las funciones respiratorias, las crisis recurrentes y las complicaciones futuras (Marandi Y, 2013).

En diferentes estudios las integrinas se han encontrado de forma soluble (Bank J, 2008) y en nuestro modelo de asma en el cobayo hemos identificado que la expresión de integrinas solubles en el suero se relaciona con el grado de fibrosis de las vías aéreas remodeladas y la inflamación (Bazán-Perkins B, 2009). Las integrinas son las principales moléculas que participan tanto en el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas como en la interacción entre los componentes de la matriz extracelular y las células estructurales de las vías aéreas (Fernandes D, 2006; Baek JK, 2013). Se ignora si los niveles de las integrinas solubles en suero de pacientes con asma se modifican durante las crisis de asma. Por lo que en este estudio de medicina traslacional queremos conocer los niveles en circulación sanguínea de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$ , así como de las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  en suero de pacientes con y sin crisis de asma. Los niveles de las integrinas solubles en suero pueden ser una herramienta para la detección y prevención de las crisis recurrentes de asma.

## 4. HIPÓTESIS

Los niveles de integrinas en circulación sanguínea aumentan en los pacientes con crisis de asma.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar los niveles de integrinas en circulación sanguínea de los pacientes con y sin crisis de asma.

### Objetivos particulares

- Cuantificar los niveles de las integrinas  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  y las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  en pacientes con y sin crisis de asma.
- En estos pacientes relacionar los niveles de las integrinas con su FEV1.
- Cuantificar los niveles de colágena I en estos mismos pacientes y relacionarlos con sus niveles de integrinas.
- Detectar las proteasas MMP2 y MMP9 involucradas en el corte proteolítico de integrinas en suero de los pacientes con y sin crisis de asma.
- Evaluar la actividad de estas proteasas en suero de los pacientes mencionados previamente.
- Relacionar la intensidad relativa de las integrinas  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ , y las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2$  con las proteasas MMP2 y MMP9.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Grupo de estudio

En este estudio se incluyeron 47 pacientes con diagnóstico previo de asma, 29 de ellos no presentaban crisis de asma durante la toma de muestra y 18 pacientes que cursaban con crisis de asma según los parámetros clínicos en el momento de la toma de muestra. Adicionalmente ingresaron al estudio 29 sujetos sanos. Todos los individuos en este estudio fueron mayores de 18 años reclutados de la Clínica de Asma y del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Para ser incluidos en este estudio, cada paciente y voluntario sano cumplieron con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación (tabla 2). Así mismo, se solicitó el consentimiento informado de todas las personas que participaron y en todo momento se mantuvo la privacidad de los datos y de los resultados obtenidos.

**Tabla 3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

<p><b>Criterios de Inclusión</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Aceptar participar en el estudio de manera voluntaria e informada.</li><li>▪ Entre 18 y 60 años de edad.</li><li>▪ Cualquier género.</li></ul> <p><i>Grupo de pacientes con asma</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Con diagnóstico médico de asma.</li><li>▪ No padecer ninguna otra neumopatía.</li></ul> <p><i>Grupo sin asma (controles sanos)</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Sin asma y sin antecedentes familiares de asma.</li></ul> <p><b>Criterios de exclusión</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Presentar una exacerbación de otra neumopatía.</li><li>▪ Padecer alguna enfermedad crónica o algún tipo de fibrosis.</li></ul> <p><b>Criterios de eliminación</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Presentar alguna infección respiratoria.</li><li>▪ Oponerse a la toma de muestra o no encontrarse en condiciones de donarla.</li><li>▪ Ser fumador.</li><li>▪ Estar embarazada.</li><li>▪ Tener algún conflicto con el manejo de sus datos o información personal.</li></ul>
--

## 6.2 Detección de los niveles de integrinas y colágena I en suero de pacientes con asma y voluntarios sanos

La determinación de las integrinas y las subunidades de integrinas así como de colágena I se realizó mediante inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de tipo directo. Se colectaron 5 ml de sangre tanto de pacientes con asma como de voluntarios sanos en tubos vacutainer tapa roja (BD, USA). Para la obtención del suero las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga (Heittich-Zentrifuge, Tultlingen, Alemania). El suero se almacenó en alícuotas a -80 °C para la posterior cuantificación de los niveles de integrinas y colágena I.

Para la cuantificación de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , así como de colágena I en suero, se sensibilizaron placas de 96 pozos (Costar, E. U.) con 50  $\mu$ l de suero de pacientes con asma o controles sanos diluidas 1:10 en una solución amortiguadora de carbonatos ( $\text{NaCO}_3$  0.015 M,  $\text{NaHCO}_3$  0.035 M, pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4°C. El volumen de las placas fue decantado y los pozos fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  88 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) y Tween 20 al 0.05% (PBS-T) (Sigma, E.U.) (PBS-T). Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con una solución de trabajo que contenía PBS-T y 1% de albúmina sérica bovina FV (Signa USA) durante 3 horas a 37 °C con agitación constante. Al término de la incubación los pozos fueron decantados y lavados con PBS-T. Posteriormente los pozos fueron incubados dos horas a temperatura ambiente y agitación constante con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 1$  humana (hecho en ratón, R&D Systems) en una concentración de 1 $\mu$ g/mL; anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 2$  humana (hecho en ratón, Millipore) en una concentración de 1 $\mu$ g/mL; anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\beta 1$  humana (hecho en ratón, Millipore) en una dilución de 1:500; anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\beta 2$  humana (hecho en ratón, R&D Systems) en una concentración de 1 $\mu$ g/mL y anticuerpo monoclonal dirigido contra colágena I humana (hecho en ratón, Abcam) en una dilución 1:1000. Al término de la incubación los pozos fueron lavados con PBS-T y se incubaron durante dos horas a 37 °C con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, E.U.) y durante diez minutos en una solución de ortofenil diaminobencidina al 0.04% (Sigma, E.U.) que contenía 0.1% de

peróxido de hidrógeno (Merck KGaA, Alemania). La reacción se detuvo con 30 µl por pozo de ácido sulfúrico 2.5 N. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector colorimétrico automatizado (LabSystems, USA).

### **6.3 Western Blot**

Las muestras de suero fueron diluidas 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos y posteriormente se cuantificaron las proteínas totales del suero mediante el método del ácido Bicinconínico (BCA) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante (Thermo Scientific, USA). Treinta µg de proteínas se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 8% bajo condiciones reductoras y posteriormente se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad, USA). Las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente con leche en polvo libre de grasas diluida al 5% en un amortiguador salino (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; pH 8) y Tween 20 al 0.05% (TBS-T) TBS-T, posteriormente las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal dirigido contra las integrinas y las MMPs (hechos en ratón, Millipore). Al término de la incubación las membranas fueron lavadas nuevamente y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a 37 °C. Finalmente se lavaron las membranas y se incubaron con una solución de luminol (5-amino-2,3-dihidro-ftalazina-1,4-diona) y peróxido de hidrógeno (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific, USA) durante un minuto. Para la detección de las bandas, las membranas se expusieron en un fotodocumentador (Chemidoc MP, BioRad, USA) y los resultados fueron cuantificados por densitometría utilizando el programa Image J.

### **6.4 Zimografía en geles de gelatina**

La actividad gelatinolítica de la MMP2 y la MMP9 en las muestras de suero fue evaluada por zimografía. Las muestras fueron ajustadas a 30 µg de proteína y analizadas en geles de poliacrilamida al 10% los cuales contenían 1 mg/ml de gelatina. Después de la electroforesis los geles fueron lavados con Triton X-100 (Sigma, St Louis MO USA) al 2.5% durante 30 minutos y puestos en el buffer de incubación (glicina 0.1 M, pH 8; CaCl<sub>2</sub> 5 mM y ZnCl 5 mM) durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0.5% y desteñidos en una solución de etanol

30% y ácido acético 10%, en el gel se observaron bandas blancas que representan la actividad enzimática en un fondo azul. El análisis cuantitativo de la actividad gelatinolítica se realizó mediante la densitometría de las bandas en el programa Image J.

## **6.5 Análisis estadístico**

Todos los datos se sometieron a la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar si tenían una distribución normal. Los valores descriptivos de las variables fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar. Las comparaciones entre los grupos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para los datos no paramétricos las comparaciones entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las asociaciones entre los niveles de las integrinas, colágena I, FEV1 y las MMPs fueron determinadas por el coeficiente de correlación de Spearman. Todas las pruebas se llevaron a cabo en el programa estadístico *Graph Pad Prism 6.05*. La significancia estadística se estableció con una  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características generales de los pacientes con asma y los controles sanos incorporados en el estudio

En este estudio se incluyeron 47 pacientes con asma de la Clínica de Asma del INER, los cuales fueron divididos en dos grupos; un grupo que durante la muestra no presentaba crisis de asma (n=29) y otro grupo que al tomarse la muestra presentaba crisis de asma (n=18), así mismo se incluyeron 29 voluntarios sanos. Las características generales de las personas incluidas en este estudio se muestran en la tabla 3. Como se esperaba el FEV1 fue menor en los pacientes con asma en comparación con los controles sanos (P<0.001). A su vez el FEV1 del grupo de los pacientes con crisis de asma disminuyó significativamente en comparación con el grupo de pacientes sin crisis de asma y los controles sanos (P<0.001). El resto de las características no mostraron cambios significativos entre los grupos.

**Tabla 4. Características generales de los grupos incluidos en el estudio.**

	Controles sanos (n=29)	Asma		Valor de P
		sin crisis (n=29)	con crisis (n=18)	
Género	Hombres: 54.8% Mujeres: 45.1%	Hombres: 41.2% Mujeres: 58.8%	Hombres: 60% Mujeres: 40%	
Edad (años)	38.6 ± 4.2	38.1 ± 3.5	34.9 ± 4.03	0.969* 0.674† 0.510‡
Peso (Kg)	66 ± 2.61	62.8 ± 5.4	76.28 ± 7.91	0.102* 0.099† 0.068‡
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 ± 0.87	26.86 ± 1.04	27.66 ± 2.13	0.860* 0.915† 0.843‡
FEV1 (% predicho)	95.5 ± 7.5	50.21 ± 2.08	36.86 ± 4.69	<b>0.01</b> *‡ <b>0.001</b> †

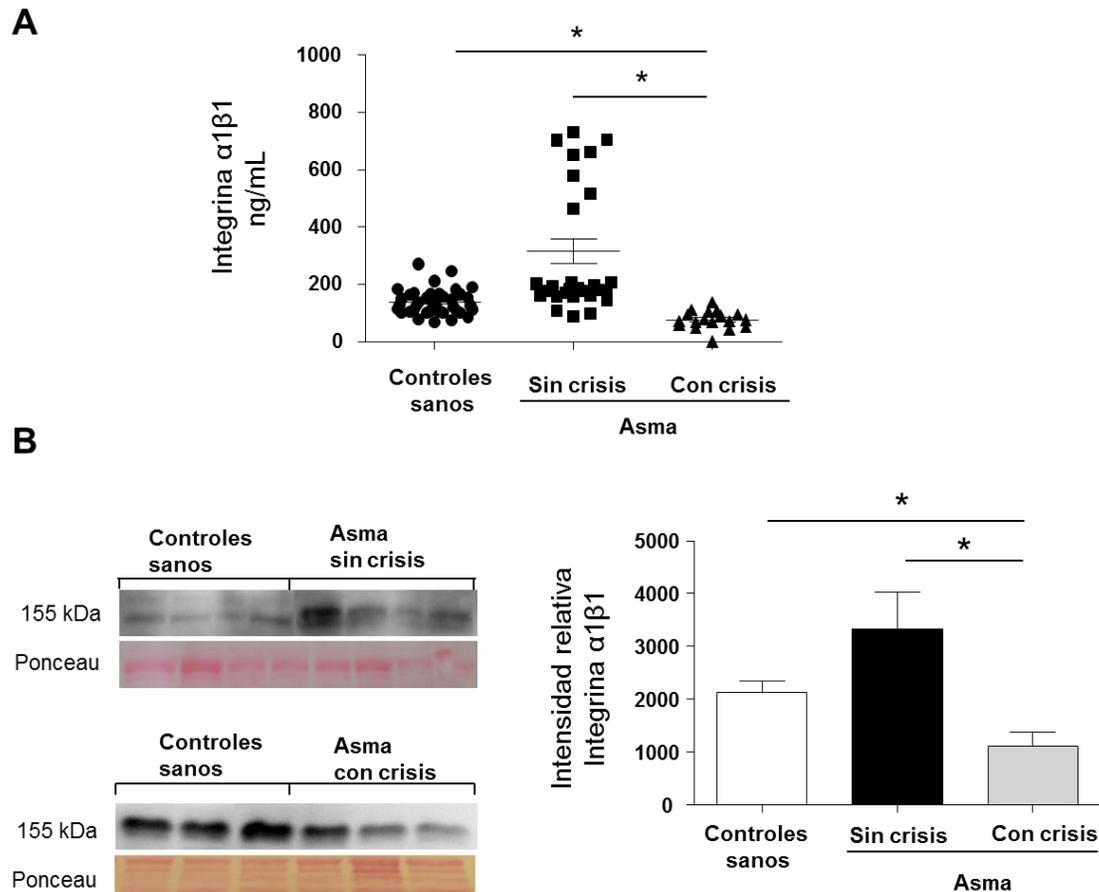
ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \*P, controles sanos vs asma sin crisis; †P, controles sanos vs asma con crisis; ‡ P, asma sin crisis vs asma con crisis.

## **7.2 Niveles de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ y la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ de integrina en el suero de pacientes con asma.**

Se obtuvo el suero de los pacientes con asma y voluntarios sanos, donde se midieron las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ , así como las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de integrinas mediante ELISA de tipo directo. Los niveles de las integrinas se expresaron en ng de integrina/mL.

En todos los grupos se detectaron ciertos niveles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de integrinas de forma soluble. Los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$ , que se expresa predominantemente sobre el tejido conectivo y que posee una alta afinidad por la colágena tipo IV, más que por la tipo I, mostraron una disminución significativa en el grupo de los pacientes con crisis de asma con respecto al grupo de pacientes sin crisis de asma y al grupo control ( $P < 0.05$ ; Fig. 7A).

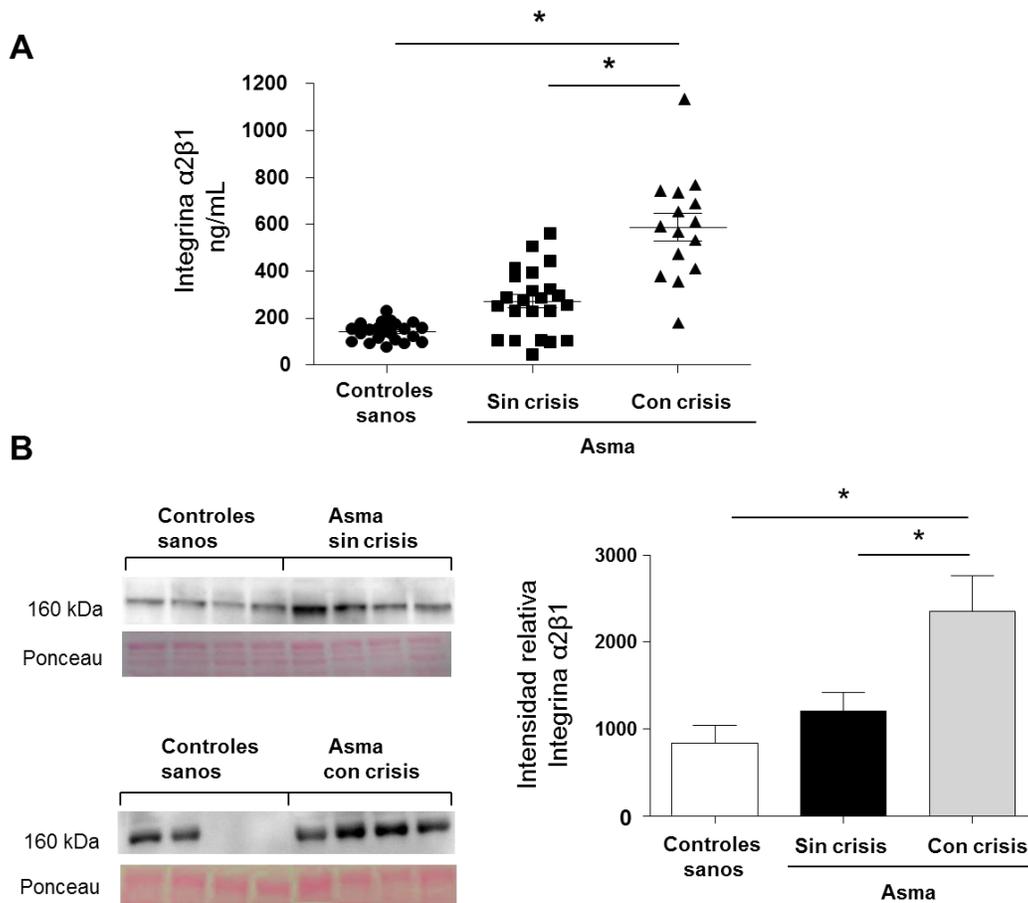
Este resultado fue corroborado posteriormente mediante un análisis de Western blot, donde se observó una banda de 155 kDa con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha 1$  de la integrina en todos los grupos. La densitometría reveló una disminución significativa sólo en el grupo de asma con crisis ( $P < 0.001$ ; Fig. 7B).



**Figura 7. A) Niveles de la integrina  $\alpha1\beta1$  en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma.** Los niveles de la integrina se expresaron en nanogramos por mililitro (ng/mL) a partir de curvas patrón con la integrina recombinante. Controles sanos,  $n=29$ ; asma sin crisis,  $n=29$ ; asma con crisis,  $n=18$ ;  $*P<0.01$  prueba de Kruskal Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn. **B) Western blot representativo y densitometría de la integrina  $\alpha1\beta1$ .**  $n=8$  por grupo, el rojo de Ponceau se utilizó como control de carga.  $*P<0.01$  ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar en (A) y (B).

Por su parte, los niveles de la integrina  $\alpha2\beta1$ , un receptor que se expresa sobre células epiteliales y fibroblastos y se une a colágenas y lamininas principalmente, mostraron un aumento significativo en el grupo de asma con crisis, en comparación con el grupo de asma sin crisis y de los controles sanos ( $P<0.01$ ; Fig. 8A). Mediante Western blot se observó una única banda de 160 kDa con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha2$  de integrina, la densitometría mostró que la integrina  $\alpha2\beta1$  aumenta de

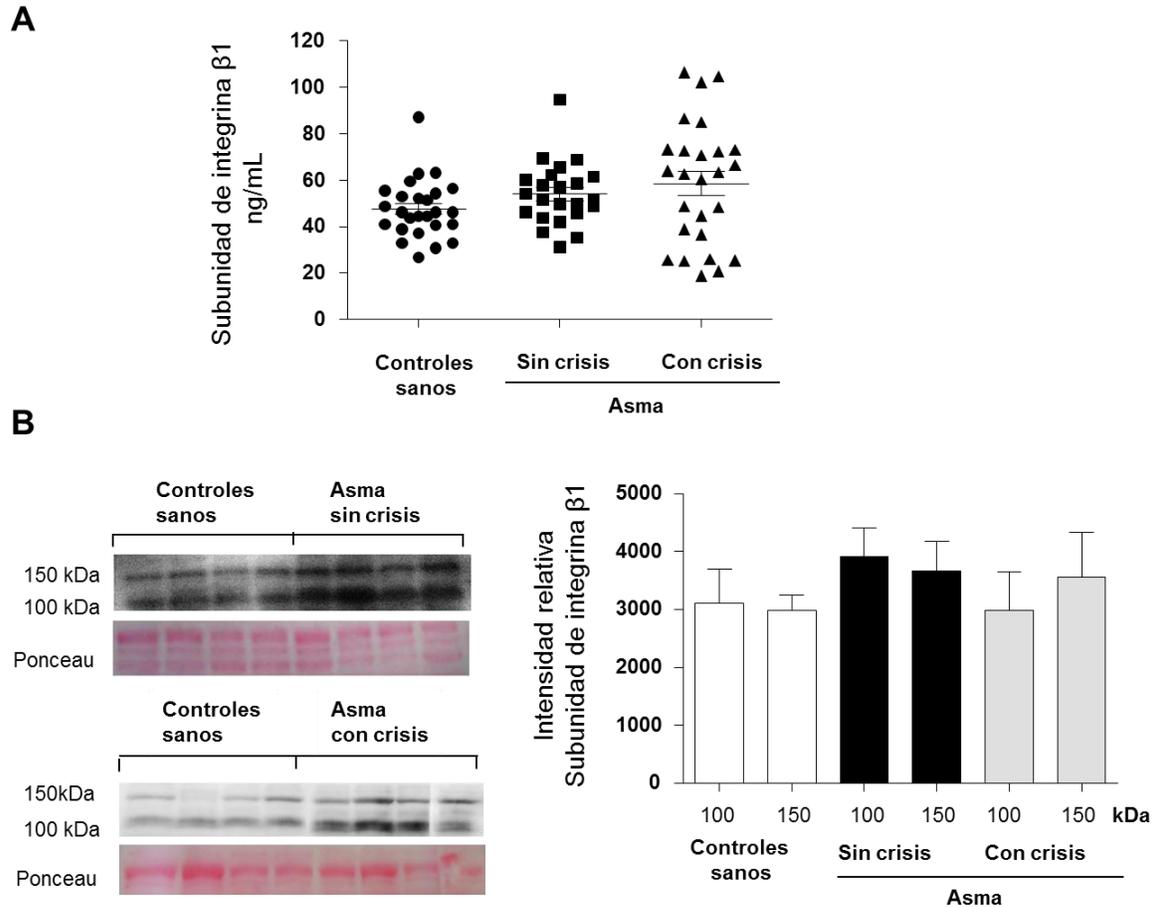
manera significativa sólo en el grupo de pacientes con crisis de asma en comparación con el grupo de asma sin crisis y los controles sanos ( $P < 0.01$ ; Fig. 8B).



**Figura 8. A) Niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en suero de controles sanos y pacientes sin crisis de asma y con crisis de asma.** Los niveles de la integrina se expresaron en nanogramos por mililitro (ng/mL) a partir de curvas patrón con la integrina recombinante. Controles sanos,  $n=29$ ; asma sin crisis,  $n=29$ ; asma con crisis,  $n=16$ ,  $*P < 0.01$  ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey. **B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .**  $n=8$  por grupo, el rojo de Ponceau se utilizó como control de carga.  $*P < 0.01$  ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar en (A) y (B).

Los niveles de la subunidad  $\beta 1$  de integrina, una subunidad que puede unirse a 12 diferentes subunidades  $\alpha$ , no mostraron cambios significativos entre los grupos. Este resultado fue corroborado mediante Western blot, donde se observaron dos bandas, una

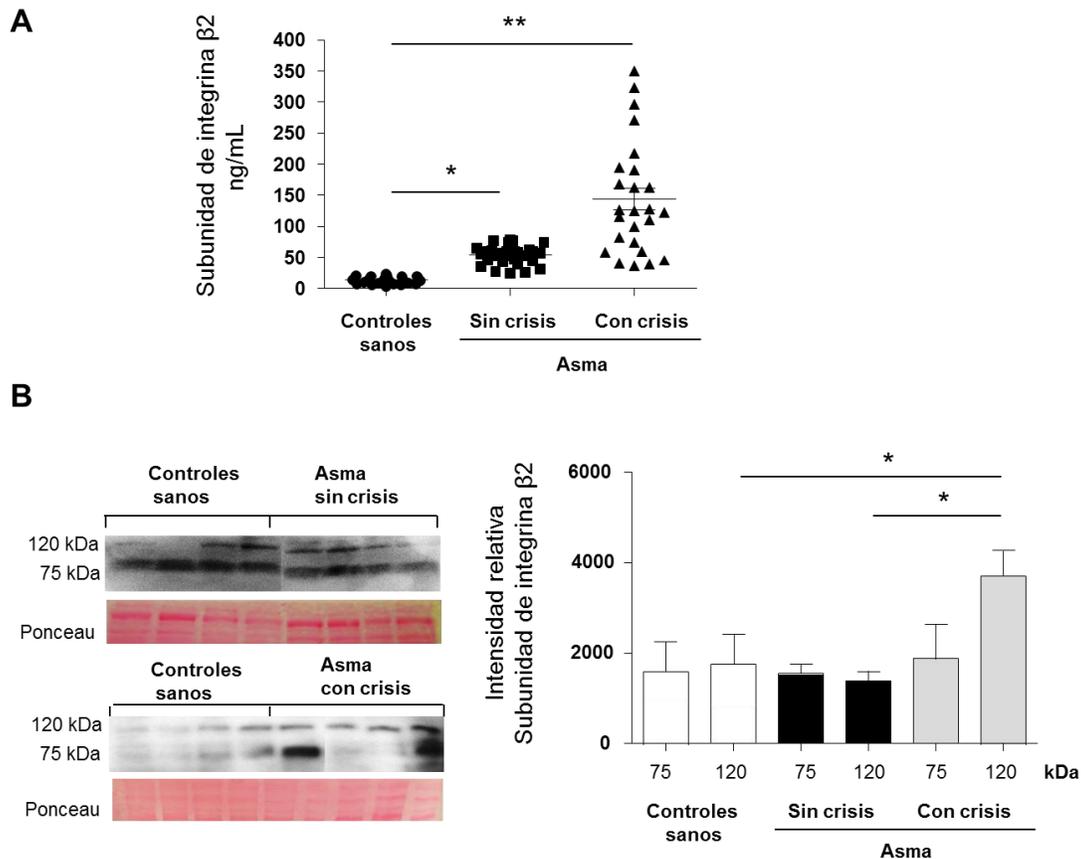
banda de 100 kDa y otra de 150 kDa que al analizarse por densitometría no mostraron cambios significativos entre los grupos (Fig. 9A y B).



**Figura 9. A) Niveles de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en suero de controles sanos y pacientes sin crisis de asma y con crisis de asma.** Los niveles de la integrina se expresaron en nanogramos por mililitro (ng/mL) a partir de curvas patrón con la integrina recombinante. Controles sanos y asma sin crisis, n=29; asma con crisis, n=26. **B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .** n=8 por grupo, el rojo de Ponceau se utilizó como control de carga. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar, ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey en (A) y (B).

Los niveles de la subunidad  $\beta 2$  de integrina, una subunidad que forma parte de las integrinas que se expresan sobre leucocitos y se unen principalmente a miembros de la familia ICAM, fueron significativamente mayores en los grupos de asma sin crisis y de asma con crisis en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$  y  $P < 0.01$ ; Fig. 10A).

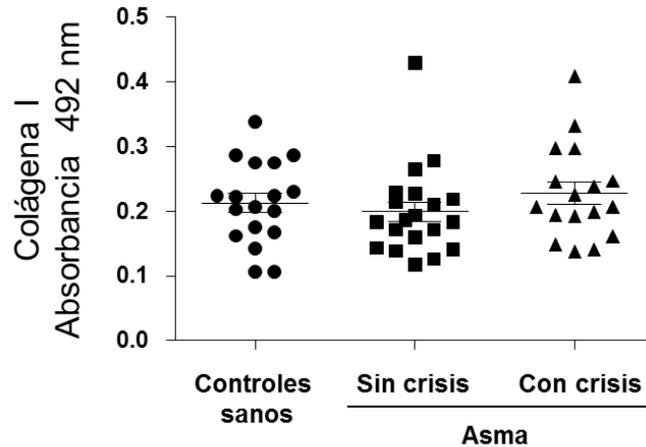
Posteriormente mediante Western blot se observó una banda de 75 kDa y otra de 120 kDa. El análisis densitométrico mostró un aumento en la intensidad relativa de ambas bandas de la subunidad  $\beta 2$  de integrina sólo en el grupo de asma con crisis, en comparación con el grupo de asma sin crisis y el grupo control (Fig. 10B).



**Figura 10. A) Niveles de la subunidad  $\beta 2$  de integrina en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma.** Los niveles de la integrina se expresaron en nanogramos por mililitro (ng/mL) a partir de curvas patrón con la integrina recombinante. Controles sanos y asma sin crisis,  $n=29$ , asma con crisis,  $n=25$ .  $*P < 0.01$   $**P < 0.001$  prueba de Kruskal Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn. **B) Western blot representativo y densitometría de la expresión de la subunidad  $\beta 2$  de integrina.**  $n=8$  por grupo, el rojo de Ponceau se utilizó como control de carga,  $*P < 0.001$  ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar en (A) y (B).

### 7.3 Niveles de colágena I en suero de pacientes con asma

Para correlacionar los niveles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  con uno de sus ligandos se determinaron los niveles de colágena I mediante ELISA en suero. Los niveles de colágena I no fueron diferentes entre los grupos (Fig. 11).



**Figura 11. Determinación de los niveles de colágena I en suero de controles sanos y pacientes con y sin crisis de asma.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de la concentración de colágena I expresada como la absorbancia a 492 nm.  $n=19$ , prueba de Kruskal Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn.

### 7.4 Relación entre el FEV1 y los niveles de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ y las subunidades de integrina $\beta 1$ y $\beta 2$

En la tabla 4 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre el FEV1 y los niveles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  así como las subunidades de integrina  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en suero de pacientes con y sin crisis de asma, así como los controles sanos.

Los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se asociaron de manera directa y estadísticamente significativa con el FEV1 ( $P < 0.001$ ,  $n=76$ ). Esta correlación indica que a mayor cantidad de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  mayor será el FEV1. Mientras que los niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades de integrina  $\beta 1$  y  $\beta 2$  se correlacionaron de manera inversa y

estadísticamente significativa con el FEV1 ( $P < 0.001$ ,  $n = 76$ ). Esto indica que a mayores niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , así como, de las subunidades de integrina  $\beta 1$  y  $\beta 2$  menor será el FEV1.

**Tabla 5. Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas y el FEV1**

	Niveles de integrinas en suero			
	$\alpha 1\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
FEV1	0.427*	-0.383*	-0.424*	-0.436*

\* $P < 0.01$ , prueba pareada de t de Student.

En la tabla 5 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de colágena I y de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ , así como, las subunidades de integrina  $\beta 1$  y  $\beta 2$ .

Sólo los niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se asociaron de manera directa y significativamente con los niveles de colágena I ( $P < 0.01$ ). Por otro lado, los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  también se asociaron de manera directa con los niveles de la subunidad  $\beta 1$  y de forma inversa con los de la subunidad  $\beta 2$ , ambas asociaciones con significancia estadística ( $P < 0.01$ ). Por su parte, los niveles de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se asociaron de manera directa y estadísticamente significativa con los niveles de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  ( $P < 0.001$ ). Finalmente, los niveles de la subunidad  $\beta 1$  se relacionaron de manera directa con los niveles de la subunidad de integrina  $\beta 2$ .

**Tabla 6. Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas, colágena I y las subunidades de integrinas.**

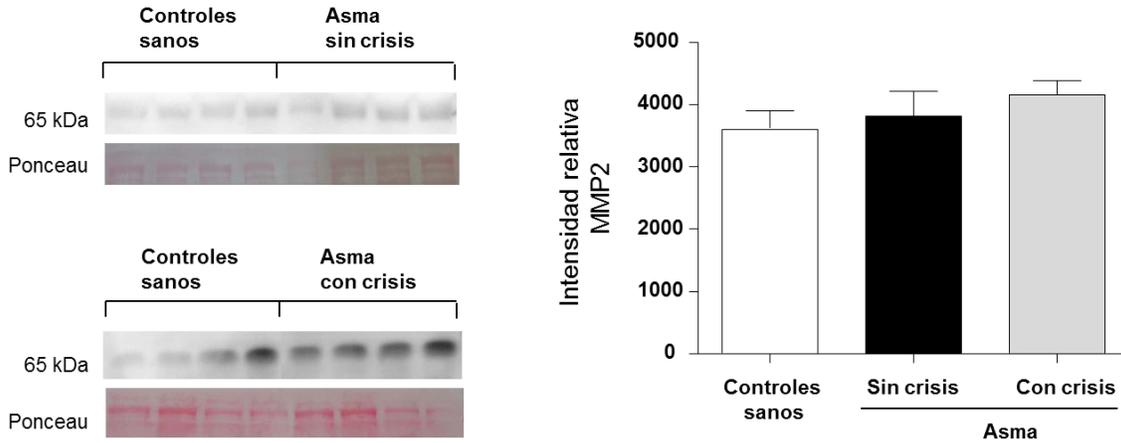
	Niveles de integrinas en suero			
	$\alpha 1\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
Colágena I	-0.218	0.400 *	0.180	0.162
$\alpha 1\beta 1$		-0.172	0.343 *	-0.328 *
$\alpha 2\beta 1$			0.733 **	0.589 **
$\beta 1$				0.714 **

\*P< 0.01, y \*\*P< 0.001. Prueba pareada de t de Student

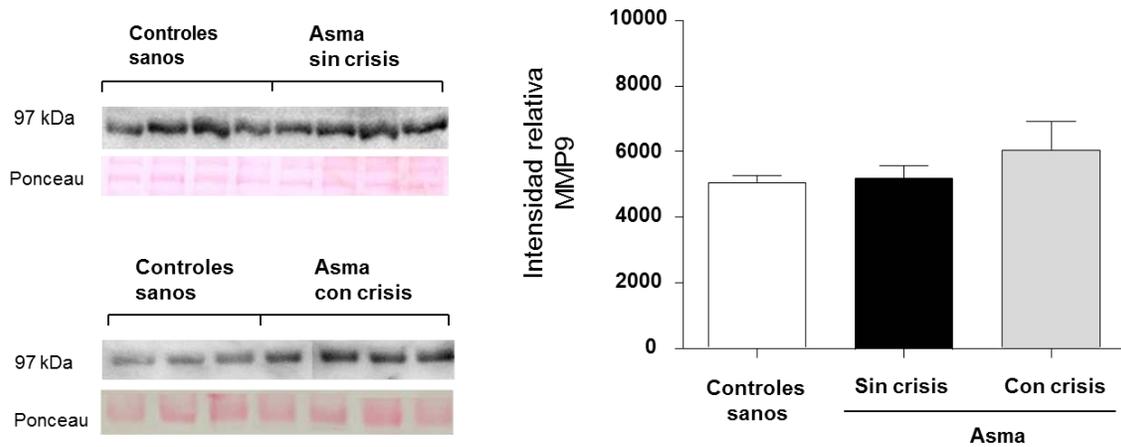
### **7.5 Detección de las MMP2 y MMP9 en suero de controles sanos y en los grupos de pacientes con asma**

Para determinar la presencia de proteasas que podrían estar participando en el *-shedding* de integrinas presentes en los pacientes de asma. Se determinó la expresión de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 mediante Western blot de suero de los pacientes con asma y los controles sanos. Estas metaloproteasas son capaces de degradar colágena tipo IV, la cual es abundante en la membrana basal de las vías aéreas.

El análisis mediante Western blot de las enzimas MMP2 y MMP9 reveló una banda de 65 kDa correspondiente a la MMP2 (Fig. 12.) y otra banda de 97 kDa correspondiente a la MMP9 (Fig. 12). El análisis densitométrico de la intensidad relativa de las enzimas MMP2 y MMP9 no mostró diferencias significativas entre los grupos (Fig. 12 y 13).



**Figura 12. Western blot representativo y densitometría de la expresión de la metaloproteasa MMP2.** El rojo de Ponceau se utilizó como control de carga. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar, n=8 por grupo. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



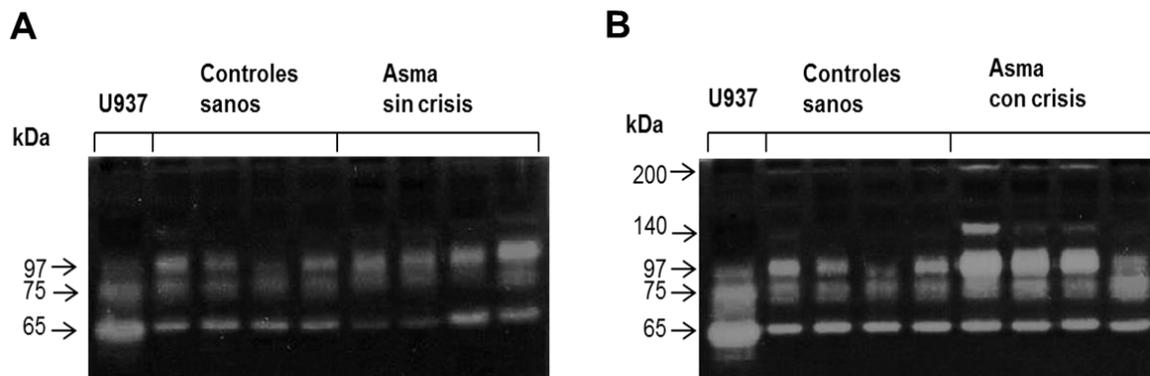
**Figura 13. Western blot representativo y densitometría de la expresión de la metaloproteasa MMP9.** El rojo de Ponceau se utilizó como control de carga. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar, n=8 por grupo. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## 7.6 Actividad de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 en suero de controles sanos y en los grupos de pacientes con asma

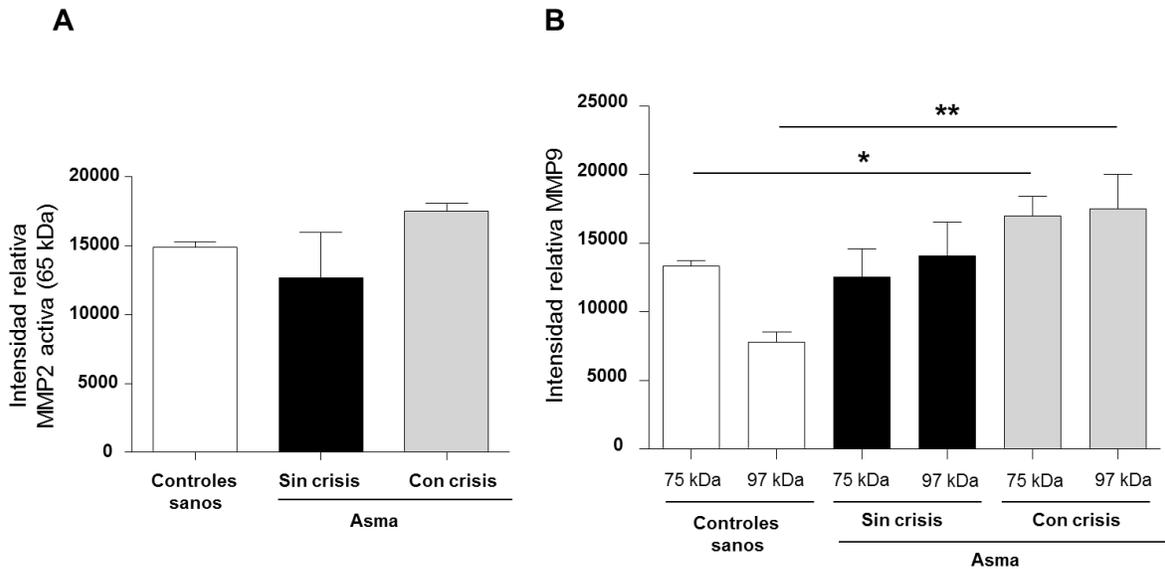
Posteriormente se analizó la actividad de las enzimas MMP2 y MMP9 en suero mediante zimografía y se utilizó la línea celular U937 como control positivo. Se observó una banda de 65 kDa que corresponde a la forma activa de la MMP2 tanto en los controles sanos como en los pacientes con y sin crisis de asma (Fig. 14A y B). El análisis densitométrico de estas bandas no mostró cambios significativos entre los grupos (Fig. 15A).

También se observaron dos bandas de 75 y de 97 kDa que corresponden a la forma activa y a la forma latente de la MMP9, respectivamente (Fig. 14A y B). La densitometría reveló un aumento en la actividad gelatinolítica tanto de la forma activa como de la forma latente sólo en pacientes con crisis de asma en comparación con el grupo de controles sanos ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente; Fig. 14B).

Adicionalmente se observó una banda de 140 kDa y otra de 200 kDa únicamente en el grupo de crisis de asma y de forma muy tenue en el grupo control (Fig. 14B).



**Figura 14. Zimograma de gelatina de sueros de controles sanos y pacientes sin crisis de asma (A) y con crisis de asma (B).** Las bandas de 65 kDa corresponden a la MMP2 activa. Las bandas de 75 kDa y 97 kDa corresponden a la forma activa y latente de la MMP9.  $n = 8$  por grupo. La línea celular U937 se utilizó como control positivo.



**Figura 15. Densitometría de las bandas con actividad gelatinolítica de la forma activa (65 kDa) de la MMP2 (A) y la forma latente (97 kDa) y activa (75 kDa) de la MMP9 (B) en sueros de controles sanos y pacientes de asma.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar,  $n=8$  por grupo, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### 7.7 Relación entre el las metaloproteasas y los niveles de integrinas en suero de pacientes con asma

En la tabla 6 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre la intensidad relativa de las metaloproteasas y las integrinas. La MMP2 activa se correlacionó de forma directa y significativa con la integrina  $\alpha 1\beta 1$  ( $P<0.01$ ), es decir, que al aumentar la MMP2 la integrina  $\alpha 1\beta 1$  también aumentan. Por su parte, la MMP9 activa y latente se correlacionó de forma directa y estadísticamente significativa con la subunidad de integrina  $\beta 2$  ( $P<0.01$ ), lo que indica que al aumentar MMP9 la subunidad de integrina  $\beta 2$  aumenta. Mientras que la MMP9 latente se asoció de forma inversa y estadísticamente significativa con la integrina  $\alpha 1\beta 1$  ( $P<0.01$  y  $P<0.001$ , respectivamente).

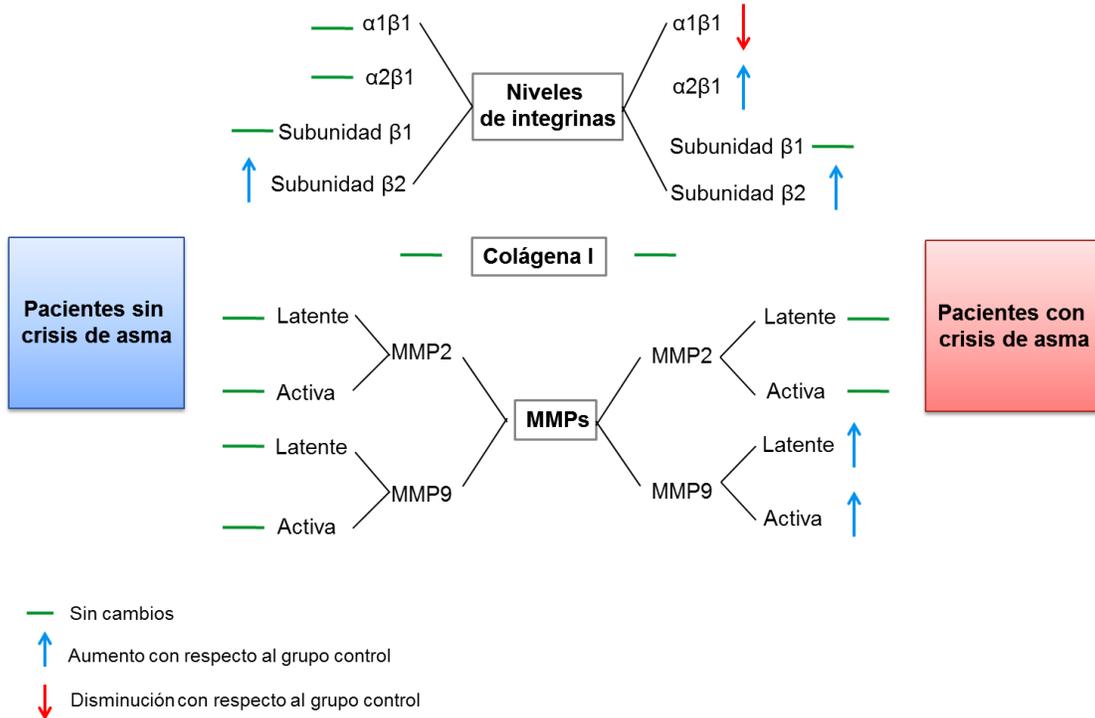
**Tabla 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de integrinas y las MMP2 y MMP9.**

	Niveles de integrinas en suero			
	$\alpha 1\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
<b>MMP2 activa (65 kDa)</b>	<b>0.484 *</b>	0.076	0.188	0.174
<b>MMP9 activa (75 kDa)</b>	-0.097	-0.160	0.139	<b>0.497 *</b>
<b>MMP9 latente (97 kDa)</b>	<b>-0.472 *</b>	-0.426	-0.419	<b>0.601 *</b>

\*P < 0.01, y \*\*P < 0.001. Prueba pareada de t de Student.

Finalmente se muestra un resumen de los resultados (Fig. 16) y en la tabla 7 se pueden observar las correlaciones directas e inversas entre los niveles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ , así como, las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  con el FEV1, la colágena I y las MMPs.

## 7.8 Resumen de los resultados



**Figura 16. Esquema representativo de los resultados obtenidos en este estudio.** Los niveles de las integrinas fueron detectados por ELISA y corroborados por Western blot. La detección de las MMPs se realizó mediante Western blot y su actividad mediante zimografía. Todas las determinaciones se realizaron en el suero de los pacientes con y sin crisis de asma y en controles sanos.

**Tabla 8. Resumen de las correlaciones**

	FEV1	Colágena I	MMP2 L A	MMP9 L A	
α1β1	+		+	-	
α2β1	-	+			
Subunidad β1	-				
Subunidad β2	-			+	+

Los signos + representan las correlaciones directas y el signo - las correlaciones inversas. L=latente; A=activa.

## 8. DISCUSIÓN

Las integrinas son molécula indispensables tanto para el tráfico leucocitario hacia los sitios de inflamación como en las interacciones entre los componentes de la matriz extracelular y las células de las vías aéreas (Fernandes D, 2006; Baek JK, 2013). En este estudio se detectaron las formas solubles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en suero de los pacientes con y sin crisis de asma, así como de controles sanos. En diferentes estudios se han encontrado formas solubles de moléculas de adhesión celular como ICAM 1, selectinas E y L en fluidos corporales de pacientes con enfermedades inflamatorias (Bank J 2008; Hayashida K, 2010). Muchos receptores presentan formas solubles que son liberadas al espacio extracelular para encontrarse con sus ligandos y/o como un mecanismos de regulación de las formas transmembranales. Diferentes concentraciones de integrinas como  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha L\beta 2$  y  $\alpha M\beta 2$  solubles han sido encontradas en diversas patologías (Bank I, 1999; Kragstrup TW 2014).

El hecho de encontrar integrinas solubles en suero indica que estos receptores pueden ser fragmentados o secretados al medio extracelular y posteriormente circular por el torrente sanguíneo. Los mecanismos que pueden dar lugar a proteínas transmembranales solubles son el corte proteolítico de dominios extracelulares (*-shedding*) o el empalme alternativo. El primero puede ocurrir mediante proteasas dando como resultado la liberación del dominio extracelular. Adicionalmente, el empalme alternativo de los transcritos de ARNm, puede generar polipéptidos que pierden su dominio transmembranal y posteriormente son secretados al medio extracelular (Hayashida K 2010).

Mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio I de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se han detectado concentraciones mayores a 3.4 ng/mL en suero (diluido 1:100) de individuos sanos (Bank I, 1999). Esta misma integrina soluble se ha detectado en una concentración de 240 a 1250 ng/mL en orina (diluida 1:2) de pacientes con nefropatía por inmunoglobulina A, no así en los sujetos sanos (Bank J, 2008). En fluido ocular posterior a la extracción de cataratas y en pacientes con adenocarcinoma pulmonar con metástasis ocular se encontró una concentración máxima de 22.1 ng/mL en los pacientes con metástasis ocular (Bank I, 2001). Nuestros resultados muestran que los niveles de  $\alpha 1\beta 1$  soluble disminuyen significativamente en los pacientes con crisis de asma. Probablemente debido a una baja expresión, una disminución en el corte proteolítico de su dominio

extracelular o porque se encuentra unido a su ligando. Este resultado concuerda con lo observado en pacientes con esclerodermia, una enfermedad fibrótica sistémica, donde los niveles de esta integrina soluble disminuyen significativamente en comparación con el control (Bank I, 1999). En nuestro estudio los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se asociaron directamente con el FEV1, por lo que, si los niveles de esta integrina disminuyen, el FEV1 también disminuye, dando como resultado una disminución en la función pulmonar, como se observa en los pacientes con crisis de asma. Se ha visto que el bloqueo de  $\alpha 1\beta 1$  se asocia con la ausencia de la respuesta inducida por el alérgeno y la hiperreactividad de las vías aéreas (Abraham WM 2004). Lo que sugiere que en los pacientes con crisis de asma esta integrina permanece asociada a sus ligandos en la matriz extracelular de las vías aéreas disminuyendo la forma soluble, lo que probablemente puede perpetuar la obstrucción de las vías aéreas.

Los estudios de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  soluble *in vitro* y del recombinante humano de esta integrina *in vivo*, prueban que la forma soluble de esta integrina conserva su capacidad de unión a ligando (Kainoh M 2002). Nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de esta integrina soluble en los pacientes con crisis de asma, los cuales se asociaron inversamente con el FEV1, por lo que si los niveles de  $\alpha 2\beta 1$  aumentan, el FEV1 disminuye. Se ha descrito que al bloquear la interacción mediada por  $\alpha 2\beta 1$  entre el músculo liso de las vías aéreas y la colágena I se reduce la hiperplasia del músculo liso (Bonacci et al, 2006). Como parte de la remodelación de las vías aéreas la hiperplasia del músculo liso provoca la reducción residual del calibre de las vías aéreas induciendo una disminución en la función pulmonar (Fahy John V, 2015). Es posible que la generación de la forma soluble de esta integrina, indique sobre-producción de la misma por parte de las células de las vías aéreas en los pacientes con crisis de asma. Por lo que, una forma de regular la interacción de esta integrina con los ligandos es el corte de la misma.

La subunidad de integrina  $\beta 1$  puede unirse a 12 diferentes subunidades  $\alpha$  (Pan L, 2016). En nuestros resultados los niveles de esta integrina no mostraron cambios significativos entre los grupos. Pero los niveles de esta subunidad se relacionaron de manera directa con las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ . Adicionalmente, los niveles de ambas integrinas fueron inversos en los pacientes con crisis de asma, esto es que mientras una aumenta la otra disminuye. Se ha mostrado una correlación entre la activación de la subunidad  $\beta 1$  de integrina de eosinófilos y la disminución en la función pulmonar en pacientes con asma no

severa (Johansson MW. 2012a). En este estudio los niveles de la subunidad  $\beta 1$  de integrina se asociaron de manera inversa con el FEV1. Es decir, si la subunidad  $\beta 1$  soluble aumenta el FEV1 disminuye. Probablemente entre las integrinas solubles que poseen la subunidad  $\beta 1$  como  $\alpha 2\beta 1$  contribuyen con la disminución de la función pulmonar en el asma.

La subunidad de integrina  $\beta 2$  se ha detectado de forma soluble junto con la subunidad  $\alpha M$  en suero y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis, así como, en voluntarios sanos en concentraciones que varían de 737 a 1310 mili-unidades por mililitro (mU/mL) (Gjelstrup LC, 2010). Otros estudios han mostrado que los niveles de la subunidad  $\beta 2$  en plasma de pacientes con espondiloartritis disminuyen en comparación con sujetos sanos (Kragstrup TW 2014). Adicionalmente la integrina  $\alpha L\beta 2$  soluble ha sido detectada en fluido de ampollas cutáneas (Evans BJ, 2006). Las integrinas que poseen la subunidad  $\beta 2$  son específicas de leucocitos y son fundamentales en la migración de éstos hacia los sitios de inflamación (Arnaout MA, 2016; Pan L, 2016). Por lo que, no sorprende su aumento en una enfermedad inflamatoria como el asma. Así mismo, esta integrina se asoció de forma inversa con el FEV1. En pacientes con asma existe un aumento en la población de neutrófilos que portan la integrina  $\alpha M\beta 2$  (Ciepiela O, 2013). Adicionalmente, las exacerbaciones de asma se asocian con un aumento en el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas principalmente neutrófilos en los pacientes adultos y de eosinófilos y neutrófilos en niños (Baek JK, 2013). Los dominios extracelulares de esta subunidad son encontrados como moléculas solubles, probablemente como un mecanismo que disminuye la adhesión al endotelio vascular de células inflamatorias y su posterior transmigración hacia las vías aéreas.

En el asma el engrosamiento de la pared de la vía aérea surge por un aumento en el depósito de componentes de la matriz extracelular, principalmente de colágena I. Se conoce que en los pacientes con asma la producción de colágena I incrementa (Johnson P, 2004). Sin embargo, en otros estudios no se han observado cambios en colágena I entre los pacientes con asma y los sujetos sanos (Chu HW, 1998). Por lo que, el incremento de colágena I en los pacientes con asma es controversial (Chu HW, 1998; Johnson P, 2004; Araujo BB, 2008). En nuestro estudio, los niveles de colágena I en suero permanecieron sin cambios entre los grupos. Sin embargo, se observó una asociación directa entre los niveles de esta colágena con los de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  soluble.

El mecanismo de regulación para la síntesis de colágena I mediado por las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  ha sido bien estudiado. La unión de  $\alpha 1\beta 1$  a su ligando activa Erk 1/2 e induce la inhibición de los genes para la síntesis de colágena I, mientras que  $\alpha 2\beta 1$  mediante la activación de la proteína p38 induce su síntesis por fibroblastos (Reunanen N, 2000). En este estudio los niveles de las integrinas solubles  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  son inversos sólo en los pacientes con crisis de asma. Los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  disminuyeron y los de  $\alpha 2\beta 1$  aumentaron. En este sentido, los pacientes con crisis de asma probablemente permanezcan con la integrina  $\alpha 1\beta 1$  transmembranal y así continuar con las señales mediadas por la esta integrina, entre estas la regulación negativa de la síntesis de colágena. Por otro lado, el aumento en la generación de  $\alpha 2\beta 1$  soluble podría ser un mecanismo de regulación para no inducir la síntesis de colágena I y su posterior acumulación en las vías aéreas. Esto podría explicar porque no hay cambios en los niveles de colágena I e indica un mecanismo de regulación en la síntesis y degradación de esta proteína durante la crisis de asma. Probablemente este mecanismo de regulación ocurre mediante la fragmentación de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y la permanencia o baja expresión de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en la superficie celular.

Por otro lado, nuestros resultados revelaron la presencia de fragmentos de las subunidades  $\beta 1$  (100 y 150 kDa) y  $\beta 2$  (75 y 120 kDa) de integrinas. No obstante, se observó sólo una banda para las subunidades de integrinas  $\alpha 1$  (155 kDa) y  $\alpha 2$  (160 kDa). Las subunidades de integrinas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  tienen un peso molecular aproximado de 130 kDa y las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de 85 y 88 kDa respectivamente (UniProt). Cabe mencionar que como cualquier otra proteína, las modificaciones post-traduccionales como la glicosilación y la fosforilación pueden generar diferentes pesos moleculares. Por ejemplo, se ha descrito que la subunidad  $\alpha 1$  puede tener un peso molecular de 190 kDa en condiciones no reductoras y de 210 kDa en condiciones reductoras, debido a su alto grado de glicosilación (Gardner H, 2014). En lo que respecta a las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Se ha reportado previamente que dos bandas son típicamente observadas en Western blot de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en células de humano; un precursor parcialmente glicosilado de 115 kDa y una forma madura totalmente glicosilada de 130 kDa (She S, 2010). Sin embargo, para ambas subunidades se han descrito fragmentos con diferentes pesos moleculares que se generan a partir del corte proteolítico de los dominios extracelulares mediante proteasas (Kryczka J, 2012; Vaisar T 2009). Adicionalmente en el estudio de Álvarez-Santos en 2016 se descartó el empalme alternativo de la subunidad

$\beta 1$  en un modelo de asma alérgica en cobayo. Esto sugiere que las integrinas son fragmentadas por proteasas como se ha descrito en estudios previos.

Uno de los mecanismos más citados para la fragmentación de receptores transmembranales es el *-shedding* de dominios extracelulares por medio de metaloproteasas. El *-shedding* es un mecanismo rápido de regulación observado en células de mamíferos en respuesta a cambios fisiológicos y del microambiente (Gun Lin 2002). Además de reducir los niveles de proteínas en la superficie celular el *-shedding* también está involucrado en la proteólisis intermembranal, el cual libera los dominios citoplasmáticos de la proteína afectada y factores de señalización asociados a esta para regular la transcripción (Hayashida K, 2010).

Se ha demostrado *in vitro* que la MMP2 es capaz de cortar integrinas  $\beta 1$  siguiendo un patrón similar para el corte proteolítico de  $\alpha 2\beta 1$  y de  $\alpha 5\beta 1$  en células de cáncer de colon, así mismo, la ruptura de las integrinas  $\beta 1$  puede ser abatida por la inhibición de MMP2 (Kryczka J 2012). En nuestro estudio se detectó la MMP2 y su actividad en suero de los pacientes con y sin crisis de asma. Nuestros resultados no mostraron cambios significativos entre los grupos. Sin embargo, se observó una asociación directa entre la intensidad relativa de MMP2 activa con la integrina  $\alpha 1\beta 1$ . Esta relación probablemente indica que la MMP2 participa en el *-shedding* de esta integrina. De ser así, esto puede explicar los bajos niveles de  $\alpha 1\beta 1$  soluble en los pacientes con crisis de asma ya que si la expresión y actividad de MMP2 no cambia en estos pacientes, probablemente la integrina  $\alpha 1\beta 1$  no sea cortada debido a la inactividad de MMP2 y disminuyan sus niveles como molécula soluble. A diferencia del estudio de Kryczka J en el 2012 no encontramos alguna asociación con la subunidad  $\alpha 2\beta 1$  y la MMP2 como, probablemente hay otra proteasa que participe en la liberación del dominio extracelular de la integrinas  $\alpha 2\beta 1$  en el asma.

Estudios *in vitro* proponen que el *-shedding* de las integrinas  $\beta 2$  es mediado por MMP9 activa y limita el flujo de macrófagos en sitios de inflamación (Gómez IG, 2012). Se ha descrito mediante análisis proteómico y de espectrometría de masas en tándem que la MMP9 activa reconoce y corta sitios del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 2$  de integrina en macrófagos en ratón (Vaisar T, 2009). Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad proteolítica de la MMP9 latente y activa en los pacientes con crisis de asma en comparación con el grupo control, lo que concuerda con el aumento de

la subunidad  $\beta 2$  de integrina soluble en suero de estos mismos pacientes. Así mismo, la MMP9 latente y activa se asoció de manera directa con esta subunidad. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que en los pacientes con crisis de asma los dominios extracelulares de las integrinas  $\beta 2$  sean liberados por *-shedding*” mediante MMP9. Cabe mencionar, que los pacientes sin crisis de asma también muestran un aumento significativo de la subunidad de integrina  $\beta 2$ . Sin embargo, la actividad de la MMP9 no muestra cambios significativos en este grupo por lo que la liberación de esta integrina en estos pacientes puede ser mediada por otras proteasas. Se ha descrito que los niveles de MMP9 en suero de pacientes con asma severa fueron significativamente mayores en comparación con los pacientes con asma controlada (Ohbayashi H, 2005; Lee YC, 2001). Esto coincide con nuestros resultados donde la MMP9 aumenta en los pacientes con crisis de asma, no así en los pacientes sin crisis.

Nuestros resultados muestran que la MMP9 latente se asoció de forma inversa con los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$ . La latencia de las MMPs es regulada por sus inhibidores endógenos como las TIMPs. Para el caso de MMP9 su inhibidor específico es TIMP-1 (Ohbayashi H, 2005). Las integrinas también pueden regular la latencia de las MMPs por medio del sistema activador de plasminogeno urocinasa (uPA, por sus siglas en inglés, *the urokinase plasminogen activator*). La activación de este sistema inicia una cascada proteolítica que resulta en la degradación de componentes de la matriz extracelular y la activación de otras proteasas como las MMPs. Adicionalmente las integrinas  $\beta 1$  pueden activar la síntesis de MMPs e inducir la activación de pro-MMPs (Yue J, 2010). En este sentido la asociación inversa de MMP9 y  $\alpha 1\beta 1$  es clara en los pacientes con crisis de asma donde se observa una disminución en los niveles de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  y un aumento significativo de la MMP9. Esta relación indica que la MMP9 no participa en el *-shedding*” de esta integrina pero si de  $\beta 2$ . Así mismo se observó una relación inversa entre la integrina  $\alpha 1\beta 1$  y la subunidad de integrina  $\beta 2$ . Es posible que la integrina  $\alpha 1\beta 1$  permanezca sobre la superficie celular y participe en la activación de la MMP9 aumentando sus niveles como se observa en los pacientes con crisis de asma.

Además de su posible papel como proteasa del dominio extracelular de las integrinas  $\beta 2$ , la MMP9 ha sido muy estudiada por su papel en el asma (Ohbayashi H, 2005). Entre las MMPs la 9 ha sido considerada la principal proteasa involucrada en la remodelación de

las vías aéreas (Lee YC, 2001; Ohbayashi H, 2005). Pues a nivel proteico y de ARNm, la MMP9 ha sido detectada en diversas muestras de pacientes con asma (Lee YC, 2001).

En nuestros resultados de zimografía se observaron bandas de MMP9 correspondientes a los 140 y 200 kDa únicamente en los pacientes con crisis de asma. Se sabe que MMP9 puede presentarse como un homodímero con un peso molecular de 200 kDa. Adicionalmente se ha descrito que los neutrófilos pueden producir un complejo de MMP9 con lipocalina con un peso molecular aproximado de 135 kDa (Van den S, 2002; Kjeldsen L, 1993). Probablemente estos complejos proteicos son los que observamos en nuestros resultados los cuales solo se presentan durante la crisis de asma.

## 9. CONCLUSIONES

- Con los resultados de éste estudio mostramos por primera vez la presencia de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  soluble en suero de humano y sus niveles aumentan durante la crisis de asma. Es posible que en la generación de la forma soluble de esta integrina no participan las proteasas MMP2 y MMP9.
- Las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  pueden tener un papel importante en la regulación de la síntesis y degradación de colágena I en el asma. Probablemente este mecanismo de regulación ocurra mediante la fragmentación de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y la permanencia o baja expresión de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en la superficie celular.
- Es probable que los mecanismos que liberan a la integrina  $\alpha 1\beta 1$  no se activen durante la crisis de asma. La inactividad de MMP2 podría estar involucrada con el *-shedding*” y la posterior disminución de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  soluble durante la crisis de asma, ya que existe una asociación directa entre ambas proteínas.
- Durante la crisis de asma los dominios extracelulares de las integrinas  $\beta 2$  probablemente son liberados por *-shedding*” mediante la MMP9 como un mecanismo de regulación de esta integrina con sus ligandos.
- La asociación directa entre la integrina  $\alpha 1\beta 1$  y la función pulmonar, así como, la asociación inversa de  $\alpha 2\beta 1$  y las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  con la función pulmonar indican que estas integrinas pueden ser posibles biomarcadores de la gravedad de la enfermedad.

## 10. PERSPECTIVAS

Corroborar la expresión de las integrinas a nivel de RNAm, de esta forma también podría observarse si existe empalme alternativo de las integrinas en los pacientes con y sin crisis de asma. Adicionalmente un análisis de citometría de flujo en leucocitos podría ayudarnos a saber si la integrina  $\alpha 1\beta 1$  permanece en la superficie de las células.

Para conocer si la MMP2 y MMP9 interactúan con las integrinas para cortarlas sería necesario realizar una co-inmunoprecipitación de las integrinas con su posible proteasa. Esto podría realice en muestras de suero y en lisado de leucocitos. Adicionalmente podrían incluirse otras proteasas como las ADAMs. Un análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en biopsias de pacientes con asma corroborarían nuestros datos.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Abraham WM, Ahmed A, Serebriakov I, Carmillo A, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber AE, GotwalsPJ, Koteliansky, Taylor F, Lobb RR. A Monoclonal Antibody to  $\alpha 1\beta 1$  Blocks Antigen-induced Airway Responses in Sheep. *Am J Respir Care Med.* 2004; 169 (1): 97-104.
2. Álvarez-Santos, Carbajal V, Téllez Jiménez O. et al. Airway hyperresponsiveness in asthma model occurs independently of secretion of  $\beta 1$  integrins in airway wall and focal adhesion proteins down regulation. *J C B.* 2016, 9999: 1-12.
3. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva L.F.F, Elliot J, Lindeman J.H.N., Ferreira D.S. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008; 32: 61–69.
4. Arnaout MA. Biology and structure of leukocyte  $\beta$  integrins and their role in inflammation [version 1; referees: 3 approved] *F1000Research.* Faculty Rev. 2016; 5: 2433.
5. Arribas J and Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev.* 2002; 102(12): 4627-38.
6. Bai TR, Vonk JM, Postma DS and Boezen HM. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *Eur Respir J.* 2007; 30: 452–456.
7. Bai TR, Vonk JM, Postma DS, et al. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *Eur Respir, 2007 J* 30:452-456.
8. Bank I, Kapyla J, Grinbaum A, Doolman R, Bank J, Sela BA. Analysis of cell-free human alpha 1 integrin with a monoclonal antibody to the I- domain: Detection in ocular fluid and function as an adhesion substrate. *Cell Commun Adhes.* 2001;8(3):113-23.
9. Bank I, Weiss P, Doolman R, Book M, Sela BA. Detection of soluble alpha1 integrin in human serum. *J Lab Clin Med.* 1999; 134 (6):599-604.
10. Bank J, Ben-David A, Doolman R, Sela BA, Bank I. Detection of alpha 1 integrin in urine of patients with immunoglobulin A nephropathy. *J Investig Med.* 2008; 56(3):581-6.
11. Barczyk M, Sergio C and Donald Gullberg. Integrins. *Cell Tissue Res;* 2010; 339:269–280.

12. Bazán-Perkins B, Sánchez-Guerrero E, Vargas MH, Martínez-Cordero E, Ramos-Ramírez P, Alvarez-Santos M, et al. Beta1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39(5):740-51.
13. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. *Can Respir J*. 2010; 17(4): e85-e94.
14. Blumbach K, Niehoff A, Belgardt BF, Harald W. Schmitz M, Hallinger R. Dwarfism in Mice Lacking Collagen-binding Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 11\beta 1$  Is Caused by Severely Diminished IGF-1 levels. *J. Biol. Chem*. 2012, 287:6431-6440.
15. Boisvert M, Gendron S, Chetoui N, Aoudjit F. Alpha 2 beta1 integrin signaling augments T cell receptor-dependent production of interferon gamma in human T cells. *Mol Immunol*. 2007; 44:3732–3740.
16. Bousquet J, Jeffery PK, Busse W, Johns, n M, Vignolia A. From Bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-1745
17. Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N and Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14(7):430-42.
18. Brennan M and Cox Dermot. The Therapeutic Potential of I-Domain Integrins 2014 En: Gullberg D. (Editor). *I Domain Integrins*. University of Bergen, Bergen Norway: Springer; 2014. p. 157-178.
19. Burgel PR, de Blic J, Chanez P, Delacourt C, Devillier P, Didier A, et al. Update on the roles of distal airways in asthma. *Eur Respir Rev*. 2009; 18(112):80-95.
20. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*; 2010, 138(2) (Suppl):4S-10S.
21. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007; 42(3):113-85.
22. Chetta A, Foresi A M, Donna MD, Bertorelli G, Pesci A and Olivieri D. Airways Remodeling Is a Distinctive Feature of Asthma and Is Related to Severity of Disease. *CHEST* 1997; 111:852-57.
23. Ciepiela O, Zawadzka-Krajewska A, Kotula I, Pyrzak B, Demkow U. Influence of sublingual immunotherapy on the expression of Mac-1 integrin in neutrophils from asthmatic children. *Adv Exp Med Biol*. 2013;756:73-80

24. Cockcroft D, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(3): 551-559.
25. Dekkers BG, Bos ST, Gosens R, HalaykoAJ, ZaagsmaJ, Meuers H. The integrin-blocking peptide RGDS inhibits airway smooth muscle remodeling in a guinea pig model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181: 556-565.
26. Edelson BT, Stricker TP, Li Z, Dickeson SK, Shepherd VL, Santoro SA, Zutter MM. Novel collectin/C1q receptor mediates mast cell activation and innate immunity. *Blood*. 2006; 107:143–150.
27. Fahy John V. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan; 15(1):57-65.
28. Fernandes DJ, Bonacci JV and Stewart AG. Extracellular Matrix, Integrins, and Mesenchymal Cell Function in the airways. *Current Drug Targets*. 2006; 7: 567-577.
29. Fotoul van der Goes TI, Rodríguez Lara N, López Valdez N. Sistema Respiratorio. En Fotoul van der Goes TI (*Coordinador*). *Histología y Biología celular*. 2da edición. México. Mc Graw Hill interamericana. 2013. p:195-205.
30. Galli SJ1, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008; 24;454(7203):445-54.
31. García-Marcos, L. Genes, medio ambiente y asma. *An Pediatric Monogr* 2004; 2(1): 9-29.
32. García-Trejo D, 2014. Expresión de las integrinas alfa-1 beta-1 y alfa-2 beta-1 solubles en un modelo de asma alérgica en cobayo. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. México, D.F. Facultad de Ciencias, UNAM.
33. Gardner H. Integrin  $\alpha 1\beta 1$ . En: Gullberg D. (Editor). *I Domain Integrins*. University of Bergen, Bergen Norway: Springer; 2014. p. 21-39.
34. Gjelstrup LC, Boesen T, Kragstrup TW, Jørgensen A, Klein NJ, Thiel S, *et al*. Shedding of large functionally active CD11/CD18 Integrin complexes from leukocyte membranes during synovial inflammation distinguishes three types of arthritis through differential epitope exposure. *J Immunol*. 2010; 185(7):4154-68.
35. Global Initiative for Asthma. (GINA) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2016. [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
36. Gomez IG, Tang J, Wilson CL, Yan W, Heinecke JW, Harlan JM, Raines EW. Metalloproteinase-mediated Shedding of Integrin  $\beta 2$  promotes macrophage efflux from inflammatory sites. *J Biol Chem*. 2012; 287(7):4581-9.

37. González-Avila G, Bazan-Perkins B, Sandoval C, Sommer B, Vadillo-Gonzalez S, Ramos C, Aquino-Galvez A. Interstitial collagen turnover during airway remodeling in acute and chronic experimental asthma. *Exp Ther Med*. 2016;12(3):1419-1427.
38. Graham LM. Classifying Asthma *Chest*. 2006; 130:13S–20S.
39. Guía de Práctica Clínica (GPC). Diagnóstico y Tratamiento Del Asma En Menores de 18 Años. México; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009.
40. Guía de Práctica Clínica (GPC). Diagnóstico, tratamiento y prevención de la exacerbación de asma en adultos. México; Instituto Mexicano del Seguro Social Guía de referencia rápida, 2017.
41. Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y and Park WP. Molecular and Cellular Mechanisms of Ectodomain Shedding. *The Anatomical Record*. 2010; 293: 925–937.
42. Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y and Park WP. Molecular and Cellular Mechanisms of Ectodomain Shedding. *The Anatomical Record*. 2010; 293:925–937.
43. Hirota N and Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Ches*.2013; 144(3):1026-32.
44. Holgate ST, Wenzel S, Dirkje S, Postma DS, Weiss TS, Renz H and Sly PD. Asthma. *Nature Primer*, 2015 (1): 1 - 22
45. Humbert M. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*. 1999; 20(11): 528-33.
46. Humpries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans*. 2000; 28(4):311-39.
47. Hynes RO and Naba A. Overview of the Matrisome— An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(1):a004903.
48. Hynes RO, Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 2002; 110: 673–687.
49. Ivaska J, Reunanen H, Westermarck J, Koivisto L, Kähäri VM, Heino J. Integrin alpha 2 beta 1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha 2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol*; 1999; 147(2): 401-416.
50. Jiménez GC, Torre BL. Diagnóstico y tratamiento de la crisis asmática en adultos. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2009; 68(S2):S123-S133.
51. Johansson MW and Mosher DF. Integrin activation states and eosinophil recruitment in asthma. *Front Pharmacol*. 2013; 4(33):1-9.

52. Johansson MW, Han TS, Gunderson KA, Busse WW, Jarjour, NN and Mosher FD. Platelet Activation, P-Selectin, and Eosinophil  $\beta$ 1 Activation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(5): 498–507.
53. Johnston NW and Sears MR. Asthma exacerbations: Epidemiology. *Thorax*. 2006; 61:722–728.
54. Johansson MW, Kelly EAB, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF. Upregulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol*. 2008; 180(11): 7622–7635.
55. Kim HY, Rosemari H, Dekruyff, Umetsu DT. The many Paths to asthma: phenotype shape by innate and adaptative immunity. *Nature immunology*. 2010, 11:557-583.
56. King CS and Moores LK. Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics. *Respiratory care* 2008; 53 (5): 568- 582.
57. Kryczka J, Stasiak M, Dziki L, Mik M , Dziki A , and. Cierniewsk CS. Matrix Metalloproteinase-2 Cleavage of the  $\beta$ 1 Integrin Ectodomain Facilitates Colon Cancer Cell Motility. *J Biol Chem*. 2012; 19;287(43):36556-66.
58. Lane S, Molina J, Plusa T: An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). *Respir Med* 2006, 100:434-450.
59. Liddington RC. Structural Aspects of Integrins. En: Gullberg D. (Editor). *I Domain Integrins*. University of Bergen, Bergen Norway: Springer; 2014. p.111-126.
60. Madamanchi A, Santoro SA, and Zutter MM.  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. En: Gullberg D. (Editor). *I Domain Integrins*. University of Bergen, Bergen Norway: Springer; 2014. p. 41-59.
61. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013; 31:3-10.
62. Marandi Y, Farahi N, Hashjin GS. Asma: beyond corticosteroid treatment. *Arch Med Sci*. 2013, 9:521-526.
63. Marta Toth and Rafael Fridman. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP 9) by Gelatin Zymography. *Methods Mol Med*. 2001; 57: 10.1385/1-59259-136-1:163.
64. Moir LM, Burgess JK, Black JL. Transforming growth factor beta 1 increases fibronectin deposition through integrin receptor alpha 5 beta 1 on human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(4):1034-9.e4.
65. Moreland LW. Gelatinase. En: Moreland LW (Editor). *Rheumatology and Immunology Therapy*. USA. Springer. 2004. pp 346.

66. Naik SP, P A M, B S J, Madhunapantula SV, Jahromi SR, Yadav MK. Evaluation of Inflammatory markers Interleukin-6 (IL-6) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Asthma. *J Asthma*. 2016 Oct 26:0. [Epub ahead of print]
67. Nguyen T., Ward P. and Hirst J.  $\beta$ 1 integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 114: 2553-2560.
68. Nielsen GK and Vorup-Jensen T. Detection of Soluble CR3 (CD11b/CD18) by Time-Resolved Immunofluorometry. En: Mihaela Gadjeva (ed.). *The Complement System: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. USA. Springer. 2014. p 355-364.
69. O' Byrne P and Inman M. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003; 411-416.
70. Ochs M and Weibel R. Functional design of the human lung for gas exchange. En: Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI and Senior RM (*Editors*). *Fishman's Pulmonary Diseases and disorders*. 5th edition. USA. Mc Graw Hill. 2015.
71. Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4 (2):177-81.
72. OMS. <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/> (consultado el 17 de agosto de 2016)
73. Page-Mc Caw, Ewald AJ and Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(3):221-33.
74. Pal-Ghosh S, Blanco T, Tadvalkar G, Pajoohesh-Ganji A, Parthasarathy A, Zieske JD, Stepp MA. MMP9 cleavage of the  $\beta$ 4 integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci*. 2011; 124 (Pt 15):2666-75.
75. Pan Li, Zhao Y, Yuan Z and Qin G. Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springer Plus*. 2016; 5:1094-1105.
76. Pozzi A, Giancotti FG, Gardner HA, Wary KK. Integrin  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol*. 1998; 142:587–594.
77. Reunanen N, Foschi M, Han J, Kahari VM. Activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000; 275:34634–34639.
78. Saglani S and Lloyd CM. Novel concepts in airway inflammation and remodelling in asthma. *Eur Respir J*. 2015; 46(6):1796-804.

79. Salas H, Fernández V, Almeida A. Clasificación del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2009. 68(S2):S143-S148.
80. She S, Xu B, He M, Lan X, Wang Q. Nm23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migration on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2010; 29(1): 93.
81. Tortora GJ and Derrickson. *Principles of anatomy and physiology*. 13 th edition. USA. John Wiley & Sons, Inc. 2014. p 919.
82. Toth M and Fridman. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Methods Mol Med*. 2001; 57:163-74.
83. UniPro. <http://www.uniprot.org/> (consultado el 26 de noviembre de 2016)
84. Vaisar T, Kassim SY, Gomez IG, Green PS, Hargarten S, Gough PJ, et al. MMP-9 sheds the beta2 integrin subunit (CD18) from macrophages. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(5):1044-60.
85. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002; 37(6):375-536.
86. Vargas-Becerra MH. Patogenia del asma. En: *Asma. Enfoque integral para Latinoamérica*. México. McGraw-Hill, 2005, Médica Panamericana.
87. Vargas-Becerra. Epidemiología. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2009a; 68(S2):S91-S97.
88. Vargas-Becerra. Fisiopatología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2009b; 68 (S2): S111-S115.
89. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8):827-39.
90. Volckaert T. and De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Lung epithelial stem cells and their niches: takes center stage Fgf10. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2014; 7(8):2-15.
91. von Bredow DC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE. Cleavage of beta 4 integrin by matrilysin. *Exp Cell Res*. 1997; 10(1):341-5.
92. Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling. *Allergology international*. *Allergol int*. 2007, 56 (4):321-329.

93. Baek KJ, Choa YJ, Rosenthala P, Alexander CL, Nizet V, and Broide DH. Hypoxia Potentiates Allergen Induction of HIF-1 $\alpha$ , Chemokines, Airway Inflammation, TGF- $\beta$ 1, and Airway Remodeling in a mouse model. *Clin Immunol.* 2013; 147(1): 27-37.
94. Bazán-Socha S, Żuk J, Plutecka H, Marcinkiewicz C, Zareba L, Musial J. 2012. Collagen Receptors  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrins are involved in transmigration of peripheral blood eosinophils, but not mononuclear cells through human microvascular endothelial cells monolayer. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 63 (4): 373-379.