



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE MYPT1 Y SU
RELACIÓN CON LA
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS
AÉREAS EN UN MODELO DE ASMA
ALÉRGICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARISOL ALVAREZ GONZÁLEZ

TUTORA:

DRA. MAYRA DINORAH ÁLVAREZ SANTOS



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

- Al apoyo recibido por el CONACYT con número de registro 294207
- Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por brindar el espacio para la realización del proyecto.

- A los miembros del comité sinodal:
 - Propietaria Dra. María Sandra Cabrera Benítez
 - Propietaria Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins
 - Propietaria Tutora Dra. Mayra Dinorah Álvarez Santos
 - Suplente Dra. Guadalupe Córdoba Rodríguez
 - Suplente Dr. Victor Manuel Ruíz López

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mis papás Soledad y Alejandro, por estar conmigo siempre, por apoyarme y darme lo todo lo necesario para poder cumplir mis metas sin importar el costo y los sacrificios que eso implique. Principalmente por darme el inmenso amor que yo también les tengo.
- A mis hermanos Alejandro y Eduardo, por apoyarme en todo momento y ser mis compañeros de vida.
- A mis ángeles del cielo, mis abuelos, que desearon verme terminando mi carrera y cumplir mis metas.
- A mis tíos, primos y sobrinos por ser parte importante de mi vida y por brindarme el calor y alegría de una familia.
- A la Dra. Mayra, por enseñarme y transmitirme todo su conocimiento dentro de la ciencia, por ser uno de mis ejemplos a seguir y por ser además que mi tutora, una gran amiga, la cual y merece toda mi admiración.
- A la Dra. Blanca por guiarme y enseñarme durante mi proceso de formación como científico, por darnos todo el apoyo necesario, por defenderme en todo momento y por ser la líder y la guía del hermoso grupo de investigación que ha formado. Además de ser una persona a la cual admiro, tengo aprecio y considero como ejemplo a seguir.
- A mis amigos del laboratorio, principalmente Yaz y Ely por ser mi compañía, mis confidentes y mi apoyo en todo momento. Por soportar juntas momentos duros y felices que nos han acompañado a lo largo de nuestra formación, y por la gran amistad que me han brindado.
- A mis grandes amigas de la carrera July, Karla, Liber, Lety e Ita. Por compartir grandes momentos que serán inolvidables y por enseñarme el valor de la amistad.
- A mi mejor amiga Ángeles, por demostrarme que, a pesar de estar lejos, estamos unidas por el corazón.
- A cada una de las personas que me acompañaron en todo momento, por sus enseñanzas, por sus alegrías, por sus tristezas, por su amistad y por el cariño que me han brindado.
- Finalmente me agradezco por nunca dejarme rendir y por dar todo lo que sé y lo que soy en cada momento. Por soportar momentos difíciles sin desmoronarme, tal como diría un poeta anónimo: “*¡Si algún día llegaras a caer, no te rindas! Haz como el sol, que cae en cada tarde, pero se levanta al amanecer*”.

En el combate de la vida nuestra arma más poderosa es el amor. El amor ahuyenta al miedo y, recíprocamente, el miedo ahuyenta al amor. Y no sólo al amor el miedo expulsa; también a la inteligencia, la bondad, todo pensamiento de belleza y verdad, y sólo queda la desesperación muda; y al final, el miedo llega a expulsar del hombre la humanidad misma.

Aquello que pensamos determina lo que somos y lo que hacemos y de forma recíproca, lo que hacemos y lo que somos determina lo que pensamos. Pero todo aquel que sepa cómo leer tiene el poder de glorificarse, de multiplicar la manera en que existe, de hacer su vida plena, importante e interesante.

- Un mundo feliz de Aldous Huxley -

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	I
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
VÍAS AÉREAS.....	1
ASMA.....	3
EPIDEMIOLOGÍA DEL ASMA.....	4
ASMA INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA.....	6
CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL ASMA.....	8
MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.....	11
MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.....	14
RELACIÓN DE LA SENSIBILIZACIÓN AL CALCIO (Ca ²⁺) CON LA HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	18
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
ANIMALES.....	25
SENSIBILIZACIÓN ANTIGÉNICA.....	25
REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	28
EUTANASIA DE ANIMALES.....	29
INMUMOHISTOQUÍMICA.....	29
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	30
INMUNOELECTROFORESIS.....	31
EXTRACCIÓN DE RNA.....	32

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)	32
ANÁLISIS <i>IN SÍLICO</i> DE SECUENCIAS DE MYPT1 DE COBAYO.....	33
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS.....	33
MATERIALES.....	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIÓN.....	72
PERSPECTIVAS.....	74
REFERENCIAS.....	75

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Pared de las vías aéreas.

Figura 2. Relación Mujer/Hombre (M:H panel superior) y Hombre/Mujer (H:M panel inferior) con respecto a grupos de diversas edades de casos nuevos de asma en la República mexicana.

Figura 3. Distribución de casos nuevos de asma por mes en la república mexicana.

Figura 4. Características y comparaciones de asma intrínseca y extrínseca.

Figura 5. Mecanismo celular más común en pacientes asmáticos de respuesta inmune Th2 en asma alérgica.

Figura 6. Fibras y células musculares.

Figura 7. Tejido muscular liso humano de la tráquea

Figura 8. Origen de los miofibroblastos e hiperplasia de la masa muscular lisa en vías aéreas asmáticas (EMT= Transición Epitelio Mesénquima).

Figura 9. Remodelación de las vías aéreas, principalmente aumento de la masa de músculo liso.

Figura 10. Mecanismos de liberación de calcio inducidas por agonistas en células del músculo liso de las vías aéreas.

Figura 11. Organización de filamentos dentro de la célula muscular lisa, agregado en forma relajada y contraída.

Figura 12. Mecanismo de fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina 20 (MLC20) en la contracción del músculo liso, vía Ca^{2+} y Rho cinasa.

Figura 13. Inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina por la cinasa de Rho.

Figura 14. Estructura de la MLCP.

Figura 15. Vía de señalización Rho/ROCK.

Figura 16. Vía de señalización de RhoA/Rho en músculo liso.

Figura 17. Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*)

Figura 18. Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*). Retos antigénicos.

Figura 19. Equipo de pletismografía barométrica.

Figura 20. Hiperreactividad de las vías aéreas inducida por reto antigénico con OVA en cobayos del modelo de asma.

Figura 21. Marca positiva para MYPT1 en músculo liso traqueal en cobayos del modelo de asma.

Figura 22. Expresión de mRNA de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos.

Figura 23. Mapa proteómico de miocitos traqueales de cobayo.

Figura 24. Mapa proteómico de miocitos traqueales de cobayo.

Figura 25. Mapa proteómico de miocitos traqueales de cobayo.

Figura 26. Mapa proteómico de miocitos traqueales de cobayo.

Figura 27. Expresión de MYPT1 en modelo de asma.

Figura 28. Expresión de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en cobayos.

Figura 29. Expresión de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en modelo de asma.

Figura 30. Expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en modelo de asma.

Figura 31. Expresión de MYPT1-Thr⁸⁵³ en modelo de asma.

Figura 32. Localización subcelular de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayo.

Figura 33. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en miocitos traqueales.

Figura 34. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en miocitos traqueales.

Figura 35. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en miocitos traqueales.

Figura 36. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁸⁵³ en miocitos traqueales.

Figura 37. Regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas en miocitos traqueales de cobayos en un modelo de asma alérgica.

Cuadro 1. Características de los componentes de vías aéreas superiores e inferiores.

Cuadro 2. Fenotipos de asma

Cuadro 3. Análisis de posibles modificaciones post-traduccionales en MYPT1 de cobayo

Cuadro 4. Correlación entre los valores de la reactividad en grupos de cobayos control y de modelo de asma con la expresión de MYPT1 y de sus formas fosforiladas de los grupos control y grupos del modelo de asma.

ABREVIATURAS

<i>Abreviaturas</i>	<i>Significado</i>
ACh	Acetil colina
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca²⁺	Ión calcio
CaM	Proteína citosólica calmodulina
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CI	Corticoesteroides inhalados
CO₂	Dióxido de carbono
CPI-17	Inhibidor de MLCP de 17 kDa
DAG	Diacilglicerol
EPOC	Enfermedad obstructiva crónica
ERC	Enfermedades respiratorias crónicas
FEV1	Volumen espiratorio forzado en un segundo
GAP	Proteínas inhibidoras de GTP-asa
GDI	Inhibidores de disociación de guanina
GDP	Molécula de energía Guanosina difosfato
GEF	Factores de intercambio de guanina
GINA	Iniciativa Global por el Asma
GTP	Molécula de energía Guanosina trifosfato
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato

IP3R	Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato
KDa	Kilodaltons, unidad de peso molecular proteico
KUxF	Motivo consenso en la Subunidad 1 reguladora de la fosfatasa de miosina que permite la unión a la fosfatasa de cadena ligera de la miosina
KVKF	Motivo de unión en la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina que media la interacción con la Subunidad 1 reguladora de la fosfatasa de miosina
MEC	Matriz extracelular
MHC	Cadena pesada de la miosina
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLC17	Cadena ligera de la miosina 17 kDa
MLC20	Cadena ligera de la miosina 20 kDa
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MYPT1	Subunidad 1 reguladora de la fosfatasa de miosina, por sus siglas en inglés <i>Myosin Phosphatase Regulatory subunit 1</i>
O₂	Ion Oxígeno
PIP2	Difosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C

PP1

Fosfatasa 1

RhoA

Proteína G monomérica asociada a la proteína cinasa Rho

RhoK/ROCK

Proteína cinasa de Rho

RyR

Receptor de rianodina

RESUMEN

La hiperreactividad definida como la exacerbación de la contracción de las vías aéreas es una de las principales características que presentan los pacientes con asma. En esta enfermedad, la desregulación de la maquinaria contracción del músculo liso de las vías aéreas podría estar involucrada en el desarrollo de la hiperreactividad. Una proteína clave en la hiperreactividad podría ser la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP, por sus siglas en inglés *Myosin Ligh Chain Phosphatase*), que desfosforila a la cadena ligera de la miosina induciendo relajación. MLCP puede ser activada o inhibida por su subunidad 1 reguladora de la fosfatasa de miosina (MYPT1, por sus siglas en inglés *Myosin Phosphatase Regulatory subunit 1*), proteína que al ser fosforilada en ciertos sitios de serinas induciendo su activación y en treoninas propicia su inactivación, esto último podría evitar la relajación del músculo liso, siendo posiblemente un mecanismo asociado a la hiperreactividad de las vías aéreas. Para evaluar la hiperreactividad, en el presente estudio, se utilizaron cobayos sensibilizados y retados con ovoalbúmina (OVA) para generar un modelo de asma alérgica y cobayos tratados sólo con solución salina fisiológica (SSF) pertenecientes al grupo de controles. Los cobayos pertenecientes al grupo del modelo de asma presentaron un aumento en la reactividad de las vías aéreas con respecto a los controles. De igual forma, la marca positiva para MYPT1 en cortes histológicos de músculo liso traqueal fue incrementada en cobayos de modelo de asma, mientras que la expresión de mRNA de MYPT1 de músculo liso traqueal analizada por RT-PCR también mostró un incremento en el grupo del modelo de asma. A nivel de proteína, el mapa proteómico de ambos grupos mostró ciertos puntos pertenecientes a diferentes proteínas con un punto isoelectrico y peso molecular específico que incrementaban o disminuían su expresión en el modelo de asma con respecto a los controles y otros más que se expresaban igual tanto en cobayos del modelo de asma como en cobayos controles. La expresión de MYPT1 y de sus principales formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ fueron evaluadas por medio de electroforesis de una y dos dimensiones con anticuerpos específicos. Dicho análisis reveló la presencia de diferentes isoformas con pesos moleculares variables para MYPT1 y sus formas fosforiladas, siendo una isoforma de 75 kDa identificada en ambos grupos para

MYPT1, MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸ y MYPT1-Thr⁸⁵³, la que muestra un incremento significativo de expresión en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles. En el caso de MYPT1-Ser⁵⁰⁷, se presentó una isoforma más de 50 kDa que también incrementó su expresión en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles. Para explicar las isoformas obtenidas, se realizó un estudio *in silico* de las modificaciones post-traduccionales que presenta MYPT1. Dicho análisis identificó que MYPT1 está sujeta a diferentes modificaciones post-traduccionales como glicosilación, N-glicosilación, O-glicosilación, fosforilación y SUMOilación que podrían regular su funcionalidad. La función también podría explicarse por la localización subcelular, por tanto, se evaluó la localización de MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en el músculo liso traqueal por medio de fraccionamiento subcelular. La localización de las isoformas antes identificadas para MYPT1 y para sus formas fosforiladas fueron observadas en citoplasma, membrana plasmática y núcleo asociado a la cromatina, a excepción de MYPT1 que no se identificó en núcleo asociado a la cromatina. MYPT1-Ser⁶⁶⁸ también se localizó en el citoesqueleto. La posible localización en núcleo fue analizada *in silico*, identificando que MYPT1 presenta dominios de acceso a núcleo que podrían trasladarla y alojarla en dicho organelo. Finalmente, un estudio de correlación mostró una posible relación entre las formas fosforiladas de MYPT1 y la hiperreactividad, en donde la forma fosforilada en MYPT1-Ser⁶⁶⁸ podría estar regulando a la hiperreactividad. En conclusión, en cobayos del modelo de asma se presenta un aumento en la hiperreactividad de las vías aéreas, se observa un aumento en la expresión del mRNA de MYPT1 en cobayos del modelo de asma con respecto al grupo control. Se identificaron isoformas de MYPT1 en el músculo liso de las vías aéreas que podrían explicarse por modificaciones post-traduccionales. Además, por un análisis *in silico* se sugiere la localización subcelular en núcleo de MYPT1. Es posible que las formas fosforiladas que presenta MYPT1 puedan estar regulando su localización y que a su vez las formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ tengan relación con la regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas.

INTRODUCCIÓN

VÍAS AÉREAS

La respiración pulmonar es un proceso que permite el intercambio gaseoso de oxígeno (O_2) presente en el aire y dióxido de carbono (CO_2) en la sangre. Dicho intercambio es realizado en el interior de dos órganos pares llamados pulmones, los cuales están compuestos principalmente por bronquios con ramificaciones, alveolos y vasos sanguíneos (Welsch Ulrich, 2008).

Los pulmones, forman parte de un complejo conocido como vías respiratorias o vías aéreas, que cumplen con la función de conducción, calentamiento y humectación del aire inspirado para la limpieza de partículas de suciedad. Las vías aéreas se dividen en superiores, englobando cavidades nasales, senos paranasales, faringe y laringe. Por otro lado, las vías aéreas inferiores agrupan a la tráquea, bronquios, bronquiolos terminales y bronquiolos respiratorios (Welsch Ulrich, 2008).

Durante el proceso de inspiración las vías aéreas conducen aire con oxígeno abundante hacia los alveolos y durante la espiración, conducen aire rico en dióxido de carbono hacia el exterior del organismo (Welsch Ulrich, 2008).

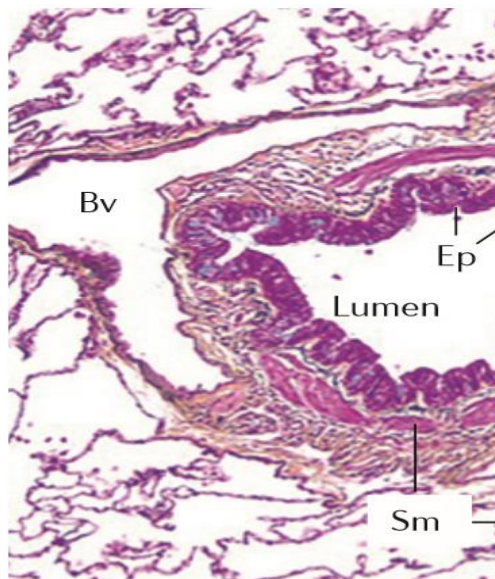


Figura 1. Pared de las vías aéreas. Músculo liso (Sm), membrana basal (Bm), vaso sanguíneo (Bv). Epitelio (Ep). Imagen tomada de Holgate et. al. 2015.

Estructuralmente, la pared de las vías aéreas (Figura 1) está compuesta por una mucosa con epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, también conocido como epitelio respiratorio, que sólo en segmentos distales como los bronquiolos, es un epitelio simple cilíndrico. Presenta también células caliciformes ciliadas y células basales posicionadas a lo largo del lumen de las vías aéreas. Debajo del epitelio se encuentra una lámina propia que contiene glándulas seromucosas, excepto en los segmentos distales. Además, contiene tejidos diversos como tejido conjuntivo, de sostén y muscular que en conjunto reciben el nombre de capa fibromusculocartilaginosa. Los componentes de dicha capa se encuentran vinculados de forma estrecha, como en el caso de la tráquea, donde los extremos libres de los anillos cartilaginosos incompletos están unidos por músculo liso traqueal y tejido conjuntivo. Cada uno de los componentes tanto de las vías aéreas superiores como de inferiores, presentan características independientes (Welsch Ulrich, 2008), las cuales son resumidas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de los componentes de vías aéreas superiores e inferiores. Información tomada de Welsch, 2008.

VÍAS AÉREAS SUPERIORES	
SEGMENTO DE LA VÍA AÉREA	CARACTERÍSTICAS
Cavidad nasal	Mucosa sobre tejido óseo de cornetes y de tabique nasal, epitelio respiratorio, sistema vascular compuesto por arterias, red capilar, plexo venoso y venas.
Senos paranasales	Epitelio respiratorio relativamente bajo con pocas células caliciformes, glándulas seromucosas infrecuentes y mucosa relativamente delgada.
Faringe	Cruza con vía digestiva. En pared se presentan 3 capas: mucosa, muscular y adventicia. Dividida en rinofaringe (respiratorio), orofaringe y laringofaringe (ambas con epitelio estratificado plano no queratinizado)
Laringe	Dividida en epiglotis (placa de cartílago elástico), pliegues vocales (epitelio estratificado plano no queratinizado) y cartílagos laríngeos (asociados a una membrana fibroelástica y músculo esquelético)
VÍAS AÉREAS INFERIORES	
Tráquea	Formada por capa mucosa de epitelio respiratorio y capa fibromusculocartilaginosa, células epiteliales con microvellosidades. Aparato mucociliar: glándulas traqueales y bronquiales, células caliciformes y cilios de epitelio respiratorio.
Bronquios	Mucosa con epitelio respiratorio, lámina propia y glándulas seromucosas. Capa muscular, capa de placas cartilaginosas, células endócrinas.
Bronquiolos terminales	Epitelio simple cilíndrico o a veces respiratorio, células caliciformes, músculo liso en red laxa, células Clara. No hay cartílago ni glándulas.
Bronquiolos respiratorios	Epitelio simple cilíndrico al principio y cúbico al final. Con dilataciones de paredes delgadas llamadas alveolos en donde se da intercambio gaseoso. Músculo grueso.

Las vías aéreas pueden ser afectadas por diferentes padecimientos, dentro de los cuales destacan las enfermedades respiratorias crónicas (ERC). Algunas de las más comunes son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón, fibrosis quística, apnea del sueño, enfermedades pulmonares ocupacionales y el asma (Chronic Respiratory Diseases, 2014). Muchas de éstas enfermedades, traen consigo un cambio estructural de las vías aéreas, que puede ser acompañado de hiperreactividad y obstrucción. Un ejemplo de lo antes mencionado, es la fisiopatología e histopatología del asma, una de las enfermedades respiratorias más importantes a nivel mundial (De Zubiría Consuegra E, *et. al*, 2004).

ASMA

La Iniciativa Global por el Asma, conocida por sus siglas en inglés como GINA, define al asma como una enfermedad respiratoria crónica común que afecta del 1-18% de la población presente en diferentes ciudades (*Global Initiative for Asthma*, 2017). El asma es caracterizada por síntomas variables como el jadeo, acompañado de dificultad para respirar, opresión en el pecho con o sin presencia de tos y una clara limitación en el flujo de aire espirado. Ambos síntomas y la limitación en el flujo de aire, son características que varían en tiempo e intensidad. Dichas variaciones pueden ser desencadenadas por diversos factores, tales como el ejercicio, exposición a alérgenos o irritantes, cambios en el clima o infecciones respiratorias virales. Tales características pueden ser resueltas espontáneamente en respuesta a medicamentos broncodilatadores, incluso pueden controlarse por algunas semanas o meses. Sin embargo, existen pacientes que presentan exacerbaciones de asma tan grandes, que pueden llegar a poner en peligro la vida y que a menudo implican una carga a nivel social e intrapersonal (*Global Initiative for Asthma*, 2017).

El asma está asociada con la hiperreactividad de las vías aéreas, ya sea de estímulo directo o indirecto, así como también con la inflamación crónica que se presenta en dichas vías aéreas. Estas características usualmente persisten, incluso cuando los síntomas son ausentes o la función del pulmón es normal, pero pueden normalizarse con tratamiento (*Global Initiative for Asthma*, 2017). Por todo lo anterior, la enfermedad es catalogada como heterogénea, ya que presenta variaciones en

aspectos demográficos y fisiopatológicos, lo que ha llevado a la determinación de diversos fenotipos de asma (Cuadro 2) (*Global Initiative for Asthma, 2017*).

Cuadro 2. Fenotipos de asma. Información tomada de *GINA, 2017*.

FENOTIPOS DE ASMA	
Asma alérgica	Fenotipo más reconocido, comienza en la niñez y está asociado con la historia de la enfermedad alérgica, rinitis alérgica o alguna alergia a algún alimento o droga. El tratamiento a seguir es la administración de corticoesteroides inhalados (CI)
Asma no alérgica	Suele presentarse en adultos y no está asociada con alergias. Presencia de células inflamatorias, neutrófilos y eosinófilos en esputo. El tratamiento a seguir es con CI.
Asma de inicio tardío	Presente en adultos, principalmente mujeres, tienden a ser no alérgicos. Suelen necesitar altas dosis de CI y algunas veces no responden a tratamientos de corticoesteroides.
Asma con limitación de flujo de aire fijo	Pacientes que desarrollan limitación de flujo de aire debido a remodelación en la pared de las vías aéreas.
Asma con obesidad	Algunos pacientes obesos con asma tienen síntomas respiratorios prominentes y poca inflamación eosinofílica en vías aéreas.

EPIDEMIOLOGÍA DEL ASMA

Dentro de la población, existen dos grandes grupos a nivel epidemiológico (Figura 2). En el primer grupo se encuentran los niños varones con asma, que pueden o no presentar alguna etapa de remisión a causa de un aumento o disminución de hormonas al llegar a la adolescencia, y por otro lado, el segundo grupo corresponde a las mujeres con asma adultas, a las cuales se les atribuye la enfermedad por un cambio hormonal que presentan a lo largo de la etapa de adultez, tal como la menopausia. Sin embargo, sea cual sea la edad o sexo del que se hable, el asma suele ser diagnosticada de manera errónea y por lo tanto recibe un tratamiento no adecuado para el fenotipo que se presenta (Holgate Stephen T, *et. al*, 2015).

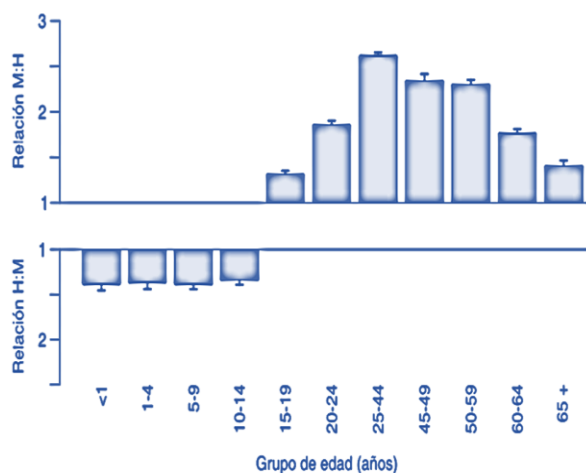


Figura 2. Relación Mujer/Hombre (M:H panel superior) y Hombre/Mujer (H:M panel inferior) con respecto a grupos de diversas edades de casos nuevos de asma en la República mexicana. Información tomada de Vargas M. 2009.

La Organización mundial de la Salud (OMS) calcula que en la actualidad hay 235 millones de pacientes con asma a nivel mundial, presentes en todos los países independientemente de su nivel de desarrollo. Sin embargo, más del 80% de muertes por dicha enfermedad tienen lugar en países de ingresos bajos y medios-bajos (Sminkey Laura, 2017). En México, por ejemplo, se estima que un 7 % de la población padece asma, lo cual significa que aproximadamente 8.5 millones de mexicanos están enfermos por este padecimiento respiratorio crónico (Larenas-Linnemann D. *et. al*, 2017). Del mismo modo, se puede hablar de una prevalencia de la enfermedad en áreas rurales, más que en urbanas, y en zonas más lejanas al Ecuador. Incluso, en estudios realizados dentro de la población mexicana, la enfermedad prevalece en regiones de menor altitud (cercanas a las costas) y puede ser que presente una tendencia de nuevos casos y exacerbaciones estacionales, ya que aumenta en ciertas temporadas del año, principalmente en los primeros y últimos meses (Figura 3). Sin embargo, no se sabe si es debido al aumento de tiempos invernales o a una mayor concentración de polen en la atmósfera (Vargas Becerra Mario Humberto, 2009).

Por todo lo anterior, se han expuesto diversas perspectivas que van relacionadas con el aumento en la especificidad de un diagnóstico certero, teniendo como objetivo el proporcionar al paciente un tratamiento adecuado que lo lleve a un mayor control del asma, mejorando directamente su calidad y estilo de vida (Larenas-Linnemann D. *et. al*, 2017).

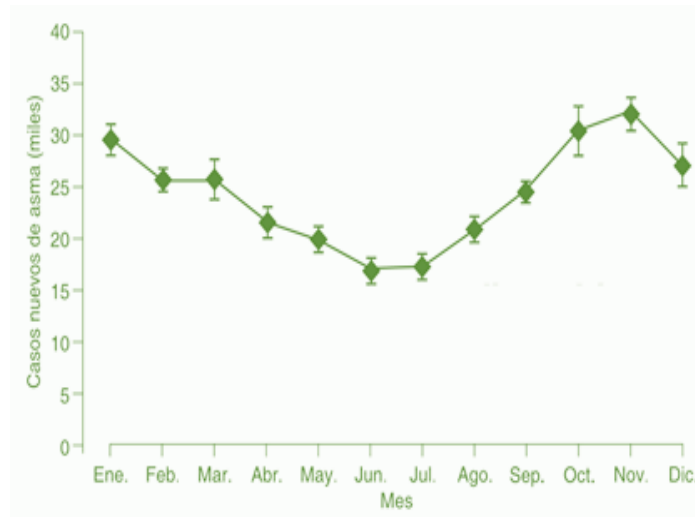


Figura 3. Distribución de casos nuevos de asma por mes en la república mexicana. Información tomada de Vargas M. 2009.

ASMA INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA

En el asma existen dos términos que se relacionan con su clasificación (Figura 4) (Harver Andrew and Kotses Harry, 2010). En primer lugar, puede hablarse del asma intrínseca, cuando está relacionada a infecciones, cambios hormonales, estímulos psicológicos o al ejercicio. Incluso, algunos pacientes experimentan disnea durante la actividad física y a la larga los lleva a suspender por completo las actividades aeróbicas (Del Río Navarro B. *et. al*, 2009). El mecanismo celular en el asma intrínseca aún se encuentra en debate.

Aspecto	Extrínseca	Intrínseca
Inicio	En la juventud	En la adultez
Síntomas	Alergia-inducida	Infección viral
Alergias	Numerosas	Ninguna
IgE sérica	IgE específica	No IgE específica
Historia familiar	Sí	No
Test cutáneo	Positivo	Negativo
Lavado bronquial	IL-2, IL-5, IL-6 e IFN- γ	IL-4 e IL-5
Producción células T	IL-3, IL-5 y FEC-G/M	IL-3,IL-5yFEC-G/M
Marcadores	Actividad crónica: CD-4+ y CD-8+	Aumento de CD-4+ e IL- 2R+

Figura 4. Características y comparaciones de asma intrínseca y extrínseca. Imagen tomada de Negrin, 2004.

Dos de las teorías más comunes que se mencionan para explicar la fisiopatología del asma intrínseca por actividad física, son la hipótesis térmica, la cual sugiere que la presencia de broncoobstrucción durante el ejercicio es causada por el incremento de la temperatura y el agua en las vías aéreas. Mientras que la teoría osmótica, plantea que la deshidratación presente durante la actividad física causa un aumento en el volumen del pulmón, dando paso a la evaporación del agua, lo que conduce a la contracción del músculo liso y al incremento en la resistencia de las vías aéreas.

En segundo lugar, se encuentra el asma extrínseca, la cual es recurrente en edades tempranas, con carga familiar de atopia, donde pruebas cutáneas resultan positivas a múltiples alérgenos ya sean intra o extradomiciliarios, los cuales son bien conocidos como causantes de exacerbaciones en el asma. Sin embargo, su papel en el desarrollo de esta enfermedad no está bien conocido (Harver Andrew and Kotses Harry, 2010).

Estudios de cohorte al nacimiento han observado que la sensibilización a ácaros, pelo de gato, pelo de perro y *Aspergillus* son factores independientes para la presencia de síntomas de asma en niños. Aunque la asociación que se presenta entre sensibilización y desarrollo de la enfermedad, no es directa, depende del alérgeno, la dosis que se emplea, el tiempo de exposición, la edad e incluso la herencia (Del Río Navarro B. *et. al*, 2009). El mecanismo a nivel celular presente en el asma extrínseca está muy estudiado (Figura 5), e incluso es el más común dentro de los pacientes con la enfermedad (Figura 4) (Fahy John V., 2015).

Sea cual sea el factor que desencadene el asma, las características típicas de la enfermedad suelen ser generales en ambos casos. Sin embargo, no todos los individuos asmáticos presentan los mismos síntomas ni las mismas respuestas a los tratamientos. Dicha variabilidad es generada por diversos mecanismos presentes dentro de la población afectada, ya que se habla de endotipos que se caracterizan por las diferencias tanto en la expresión celular (linfocitos Th2, Th1, Th17, Th9, etc.) como en la expresión de diferentes quimiocinas y citocinas durante las etapas de la enfermedad (Fahy John V., 2015).

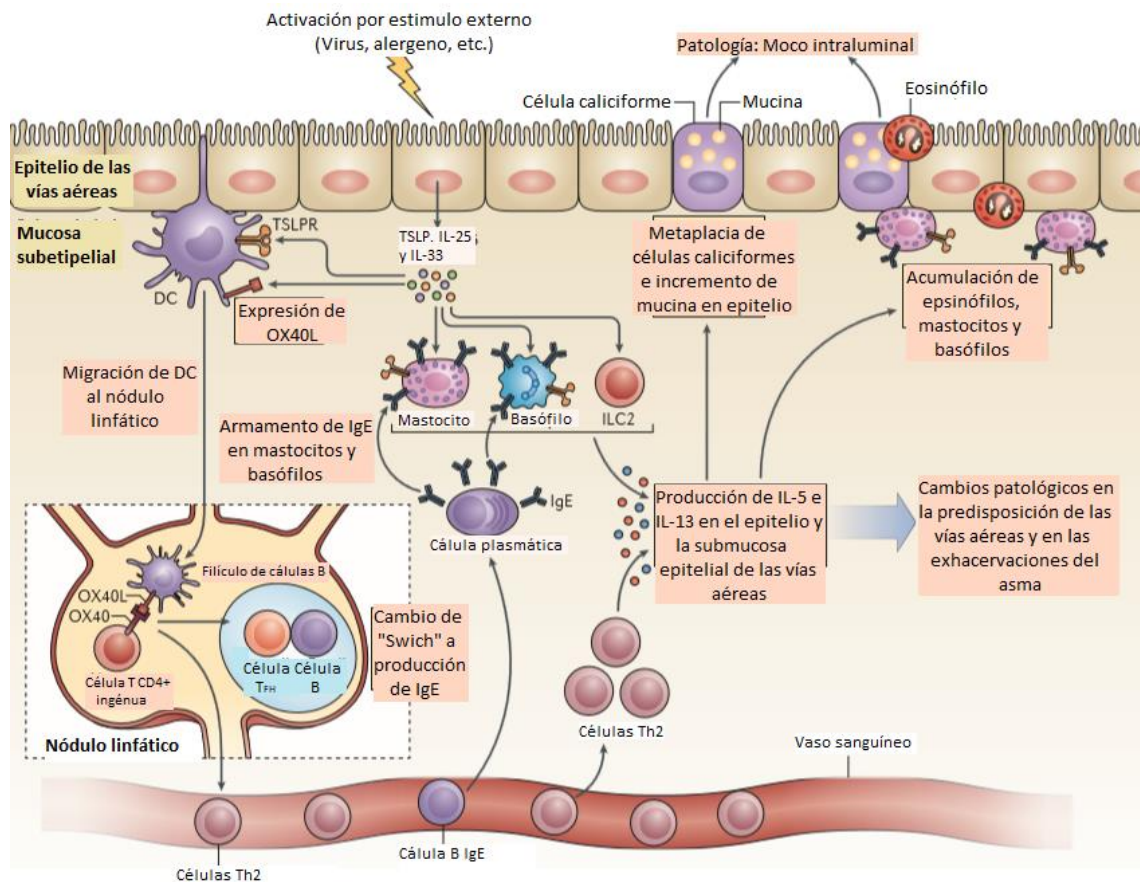


Figura 5. Mecanismo celular más común en pacientes asmáticos de respuesta inmune Th2 en asma alérgica. Imagen tomada de *Fahy, 2015*.

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL ASMA

Dentro del asma existen tres alteraciones funcionales básicas: la obstrucción del flujo de aire, la remodelación estructural y la hiperreactividad de las vías aéreas.

Diversos factores pueden regular el tono muscular de las vías aéreas, tales como las células residentes (mastocitos, células epiteliales, células endoteliales, macrófagos) y células inflamatorias migrantes (eosinófilos, linfocitos, basófilos neutrófilos y plaquetas) las cuales son capaces de liberar sustancias proinflamatorias que desencadenan la contracción del músculo liso de las vías aéreas y con ello un proceso de obstrucción (Mendez J. *et. al*, 2008).

Las vías aéreas son estructuras dinámicas que pueden modificar el calibre en respuesta a estímulos y factores ambientales, lo que permite una mayor o menor entrada de aire a los pulmones. En los individuos que no presentan asma, las vías

aéreas pueden relajarse y abrirse cuando se inhala y exhala el aire, permitiendo la entrada del flujo aéreo a los pulmones. En pacientes con asma las vías aéreas no se relajan, sino que se reduce el lumen de tal forma que se presenta una dificultad para respirar, lo cual se conoce como obstrucción de las vías aéreas (Mendez J. *et. al*, 2008). Por otro lado, el músculo liso que rodea las vías aéreas se acorta cuando se activa, lo que implica un estrechamiento del lumen. En individuos sanos sometidos a exposición con agonistas contráctiles inespecíficos, el estrechamiento de las vías aéreas es limitado reflejándose en una meseta de curva dosis-respuesta que corresponde a niveles modestos de estrechamiento. En comparación con la respuesta de un sujeto sano, la meseta de la curva dosis-respuesta del individuo con asma es elevada, indicando un acortamiento del músculo liso de las vías aéreas, es decir, se da el cierre u obstrucción (Fredberg, J. J., 2001).

Varios estudios han demostrado, que las personas con asma, como grupo, presentan una aceleración en el índice de deterioro funcional respiratorio. Pacientes con asma experimentan una mayor disminución en la función de las vías aéreas debido a la obstrucción que se presenta (Elias, J. A., *et. al*, 1999). Lo anterior es medido por el índice de volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1), el cual se refiere a la cantidad máxima de aire que se puede exhalar en un segundo. Esto se convierte en un porcentaje que se relaciona con el peso y la altura del individuo, obteniendo un marcador para determinar el nivel de obstrucción en el que se encuentra el paciente (Bass Pat and Jelic Sanja, 2017). Los porcentajes que infieren el grado de obstrucción se definen de la siguiente manera:

- FEV1 mayor a 80% de lo predicho = normal
- FEV1 60% a 79% de lo pronosticado = Obstrucción leve
- FEV1 40% a 59% de lo predicho = Obstrucción moderada
- FEV1 menos del 40% de lo predicho = Obstrucción severa

Las observaciones clínicas de la función pulmonar en pacientes con asma han llevado a definir a la obstrucción como reversible. Sin embargo, dicha obstrucción en algunos casos, cuando ha llegado a ser crónica, puede catalogarse como una función pulmonar irreversible, propiciando a la remodelación de las vías aéreas (Lange Peter, 2013).

La remodelación de las vías aéreas, se puede definir como un término colectivo que abarca alteraciones estructurales en células y tejidos, destacando el engrosamiento de la pared, la fibrosis subepitelial, metaplasia de la mucosa, hiperplasia de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de miocitos de músculo liso e hipertrofia epitelial (Elias, J. A., *et. al*, 1999).

Muchos elementos contribuyen al engrosamiento de la pared de las vías aéreas, incluido un aumento en el músculo liso, edema, infiltración de células inflamatorias, hipertrofia glandular y deposición de tejido conectivo. Incluso el grosor de la pared de las vías aéreas aumenta de 50-300% en casos de asma fatal y de 10-100% en casos de asma no fatal. En la fibrosis subepitelial, el engrosamiento es resultado de una respuesta fibrótica en la lámina reticular, caracterizada por la acumulación de colágena I, colágena III y colágena V, fibronectina, tenascina C y laminina. Aún no está claro el papel de la fibrosis en el asma, pero ha sido relacionado con la gravedad de la enfermedad y con la disminución del FEV1. Otra de las características más estudiadas es la metaplasia de moco producido por glándulas subepiteliales. El moco suele ocupar un mayor porcentaje en el lumen de las vías aéreas contribuyendo a la obstrucción que se observa en el asma (Elias, J. A., *et. al*, 1999).

La asociación entre el calibre reducido de las vías aéreas causado por la contracción del músculo liso, la obstrucción, el edema y la remodelación llevan a una respuesta broncoconstrictora exagerada que induce un bronco espasmo más intenso del que se observa en individuos sanos que son expuestos a los mismos estímulos, esto es lo que se define como hiperreactividad de las vías aéreas en el asma (Grootendorst D. C. and Rabe K. F., 2004).

Estudios epidemiológicos han identificado factores de riesgo involucrados con la hiperreactividad de las vías aéreas asintomáticas (personas que no presentan asma), involucrando la función pulmonar, la atopia, el sexo, la edad y el tabaquismo. Por ejemplo, en niños sin asma la hiperreactividad es aproximadamente dos veces más frecuente en niños que en niñas, o en el caso del tabaquismo, el fumar provoca un aumento en el número de células inflamatorias en las vías aéreas que a su vez puede inducir la hiperreactividad (Grootendorst D. C. and Rabe K. F., 2004).

La hiperreactividad es una característica importante en el asma, aunque no ocurre en la totalidad de los pacientes. Sin embargo, el aumento en la masa del músculo liso en el asma conduce a cambios de espesor de las vías aéreas. Aunado a lo anterior con la fibrosis subepitelial, promueven un fenotipo más contráctil que desencadena en el aumento de la hiperreactividad. Además, el aumento de la masa del músculo liso de las vías aéreas, la interacción entre las células del músculo liso y las estructuras circundantes tales como los constituyentes de las vías aéreas y el parénquima pulmonar, se consideran características importantes en la hiperreactividad, lo que podría indicar que el músculo liso de las vías aéreas es el principal modulador de la hiperreactividad en pacientes con asma (Grootendorst D. C. and Rabe K. F., 2004).

MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

La contractilidad es una característica típica de todas las células, sin embargo, los miocitos presentes en el tejido muscular se caracterizan por poseer dicha propiedad como la primordial, siendo parte de su función principal. Existen tres tipos de células musculares, el tejido muscular cardiaco, esquelético y liso, siendo este último el que se encuentra presente en las vías aéreas del sistema respiratorio (Figura 6) (Welsch Ulrich, 2008).

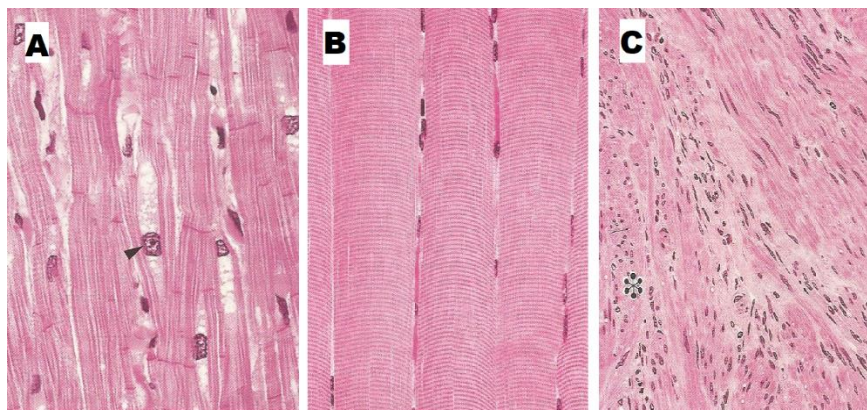


Figura 6. Fibras y células musculares. (A) Tejido muscular cardiaco humano (corte longitudinal), (B) Tejido muscular esquelético humano (corte longitudinal) y (C) Tejido muscular liso humano (vista general). Imagen tomada de Welsch 2008.

El tejido muscular liso esta inervado por el sistema nervioso autónomo, aunque suele responder a diversos estímulos. Dicho tejido no se fatiga con rapidez y presenta gran fuerza de contracción durante lapsos prolongados. Las células que conforman el músculo liso son llamadas fibras musculares lisas, que se caracterizan por su forma fusiforme delgada y organización casi paralela (Figura 7) (Welsch Ulrich, 2008).

Otra característica de las células musculares lisas, es la capacidad de sintetizar componentes de matriz extracelular (MEC), tales como colágena, laminina, fibrilina, elastina y proteoglucanos, principalmente posicionadas en la pared del lumen de las vías aéreas (Welsch Ulrich, 2008).

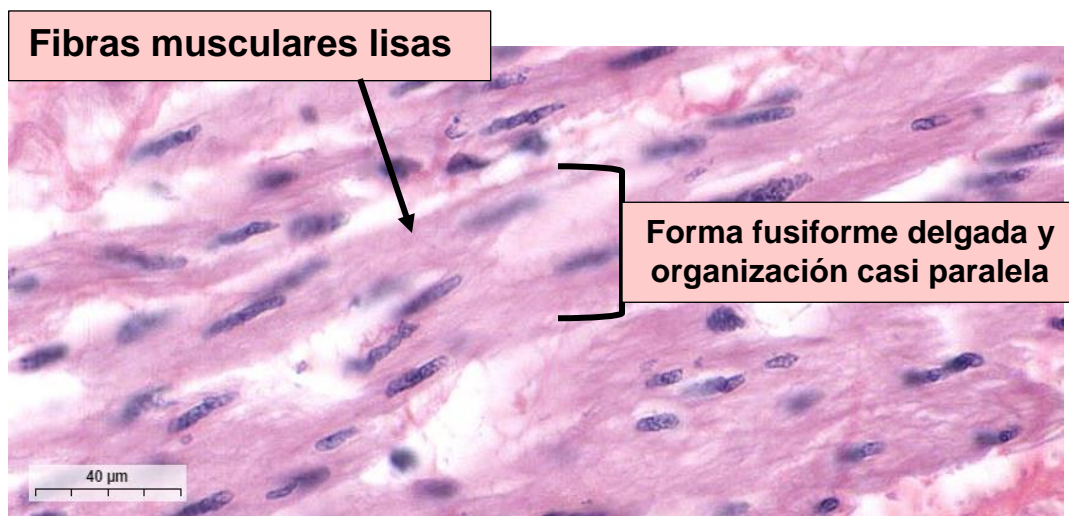


Figura 7. Tejido muscular liso humano de la tráquea. Forma fusiforme de las fibras musculares y su organización casi paralela. Tomado de Sorenson and Brelje 2014.

En las vías aéreas, así como en los sitios en donde se presenta el musculo liso, se observan células llamadas miofibroblastos, las cuales poseen características intermedias entre fibroblastos y células musculares (Welsch Ulrich, 2008). La producción de miofibroblastos puede ser a partir de transiciones de epitelio-mesénquima, partiendo de la migración de células externas a las vías aéreas, presentando finalmente una transición a miocitos, ya posicionados en la pared aérea (Figura 8).

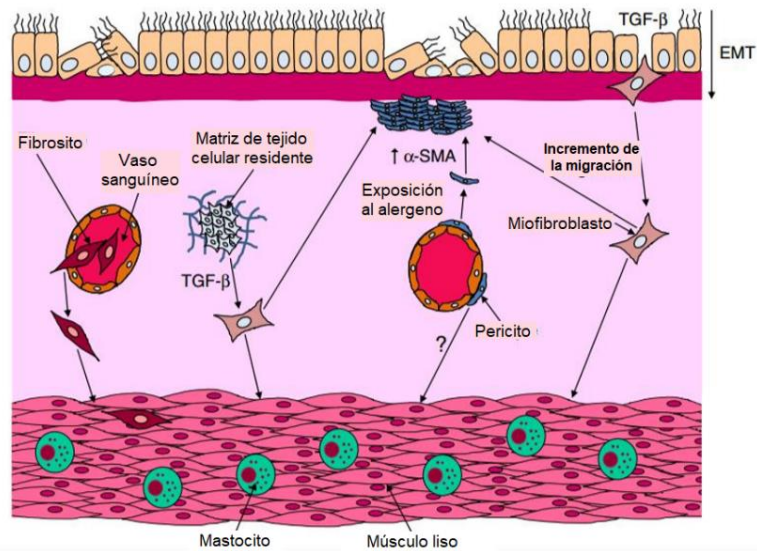


Figura 8. Origen de los miofibroblastos e hiperplasia de la masa muscular lisa en vías aéreas asmáticas (EMT= Transición Epitelio Mesénquima). Imagen tomada de *Berair et, al. 2013*

Esto es importante, ya que principalmente en el asma, la remodelación estructural de las vías aéreas es causada por el aumento de la masa muscular lisa, caracterizada por la presencia de hiperplasia e hipertrofia de miofibroblastos y de las células musculares lisas en general, además de la secreción de matriz extracelular por parte del músculo liso, desencadenando el engrosamiento de las vías aéreas, la broncoobstrucción y la crisis asmática (Figura 9) (Berair R., Saunders R. and Brightling C., 2013).

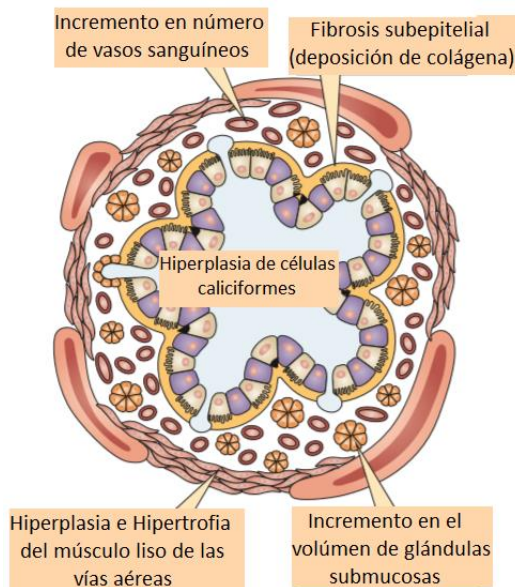


Figura 9. Remodelación de las vías aéreas, principalmente aumento de la masa de músculo liso. Imagen tomada de *Fahy, 2015*

También se ha evidenciado el aumento de la masa del músculo liso principalmente en pacientes con asma alérgica, el cual se relaciona con un incremento en diversas proteínas, especialmente enzimas relacionadas con la fosforilación de la miosina del músculo liso durante la contracción (H. Meurs, R. Gosens and J. Zaagsma. (2008).

MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

El estado contráctil del músculo liso de las vías aéreas está regulado por una serie de agonistas extracelulares que presentan un receptor específico en la membrana plasmática de las células musculares lisas. Los mensajeros celulares más comunes que inducen a una contracción del músculo liso de las vías aéreas, generalmente son neurotransmisores del sistema nervioso tales como la acetil colina (ACh), la cual es la encargada de la activación de receptores muscarínicos M3 responsables de la contracción muscular y de la activación de los receptores M2 que están implicados en la inhibición de la liberación de ACh. De igual manera, algunos mediadores epiteliales y mediadores liberados de células inflamatorias como la histamina, endotelina, ATP y metabolitos del ácido araquidónico pueden modular la contracción muscular de las vías aéreas (Ouedraogo N, Roux E., 2014).

El principal factor para que se active el mecanismo de la contracción muscular es el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en los miocitos. El Ca^{2+} puede pasar de valores de concentración en reposo de 10^{-7} M antes de que se active el mecanismo de contracción, hasta aproximadamente 10^{-5} M cuando el mecanismo de contracción muscular se activa. Dicho aumento en las concentraciones del Ca^{2+} , es producto de la despolarización de la membrana plasmática de los miocitos, la cual es controlada por canales de K^+ , cuya apertura induce la salida del ion, manteniendo un voltaje bajo en la membrana plasmática. La despolarización también está controlada por canales de Ca^{2+} activados por el aumento del mismo Ca^{2+} o por Na^{2+} a través de canales catiónicos generalmente activados por un ligando específico (Ouedraogo N, Roux E., 2014, Makoto Kudo *et. al*, 2013). Una vez que se activan los receptores que

Regulación de la contracción de las células del músculo liso de las vías aéreas

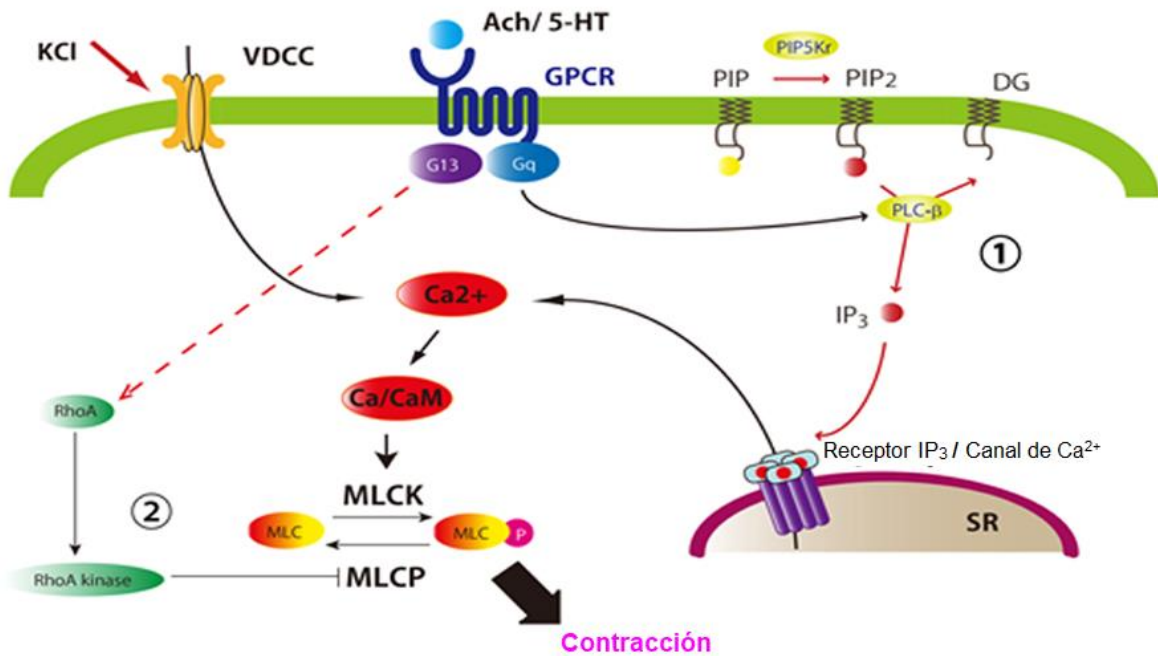


Figura 10. Mecanismos de liberación de calcio inducidas por agonistas en células del músculo liso de las vías aéreas. El agonista que en este caso es la acetil colina (Ach) se une a su receptor presente en la membrana plasmática del miocito, el cual se encuentra acoplado a una proteína G que es la encargada de activar a la fosfolipasa C (PLC). La PLC hidroliza al Difosfatidilinositol (PIP2) obteniendo Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato IP₃. El IP₃ difunde en el citosol y se une a su receptor específico ubicado en la membrana del retículo sarcoplásmico (SR). La apertura de este canal induce la liberación del calcio intracelular. La despolarización de membrana debido a la liberación de iones de Cl⁻ al exterior de la célula induce la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje. La entrada de calcio por los canales dependientes de voltaje junto con la liberación de calcio intracelular, disparan el mecanismo de contracción. Tomado de *Makoto et, al 2013*.

se encuentran en la membrana plasmática de los miocitos, se activa de forma directa a la proteína Gq / 11 que a su vez activa a la enzima fosfolipasa C (PLC por sus siglas en inglés *Phospholipase C*). La PLC cataliza la hidrólisis del difosfato de fosfatidilinositol (PIP2 por sus siglas en inglés *Diphosphate of Phosphatidylinositol*) en diacilglicerol (DAG por sus siglas en inglés *Deacylglycerol*) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3 por sus siglas en inglés *inositol 1- 4-5-trisphosphate*), éste último se une a su receptor IP3R (por sus siglas en inglés *inositol 1-4-5-trisphosphate receptor*), que está ubicado en la membrana del retículo sarcoplásmico, desencadenando la liberación de Ca²⁺ hacia el citosol (Figura 10). Otro canal de Ca²⁺ que se encuentra en el retículo sarcoplásmico, es el canal sensible a la rianodina (RyR), el cual se activa con el aumento de Ca²⁺ intracelular y con ADP-ribosa cíclica. La activación de RyR tras la estimulación contráctil puede contribuir a la liberación de Cl⁻ y a un aumento inicial de las

concentraciones de Ca^{2+} intracelular. El mecanismo antes mencionado se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Figura 10). Las ventajas que ofrece este mecanismo es que la contracción sea más rápida y de respuesta más intensa (Ouedraogo N, Roux E., 2014).

Anatómicamente el aparato contráctil del músculo liso, en general, incluyendo el de las vías aéreas, está compuesto básicamente por filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina, además de proteínas asociadas, que en conjunto se encuentran organizados en sarcómeros, formando a su vez miofibrillas individualizadas. Los filamentos gruesos se anclan en cuerpos densos en la membrana plasmática y los filamentos de actina se colocan entre los filamentos gruesos. Ambos filamentos se encuentran conectados por filamentos intermedios no contráctiles constituyendo una red intracelular (Figura 11) (Deng, M. *et. al*, 2011). La clasificación de las fibras musculares se realiza en función del tipo de miosina que se encuentre en la célula y de la velocidad de acortamiento de la célula. La molécula de miosina se compone de seis proteínas más pequeñas, dos de ellas reciben el nombre de cadenas pesadas de la miosina (MHC por sus siglas en inglés *Myosin Heavy Chain*) y las otras cuatro el de cadenas ligeras de la miosina (MLC por sus siglas en inglés *Myosin Light Chain*) (López J. y Fernández A., 2008).

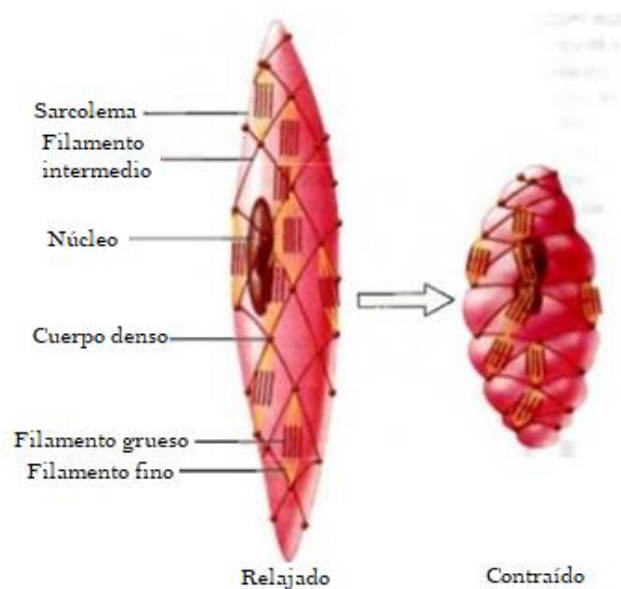


Figura 11. Organización de filamentos dentro de la célula muscular lisa, agregado en forma relajada y contraída. Tomado de *Tortora 2006*.

En el caso del filamento de miosina presente en el músculo liso de las vías aéreas, una de las cadenas ligeras de miosina presenta un peso molecular de 17 kDa (MLC17 por sus siglas en inglés *Myosin Light Chain 17*) y la otra posee un peso de 20 kDa (MLC20 por sus siglas en inglés *Myosin Light Chain 20*). El papel de MLC17 no está de todo claro, sin embargo, en el caso de MLC20 se sabe que se requiere de su fosforilación para la unión de actina-miosina, que finalmente desencadenará el mecanismo de la contracción muscular. MLC20 es fosforilada por la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK por sus siglas en inglés *Myosin Light Chain kinase*), mientras que su desfosforilación es realizada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP *Myosin Light Chain Phosphatase*) (Figura 12). Para que se lleve a cabo dicho mecanismo, el Ca^{2+} que fue liberado previamente, se encuentra en altas concentraciones y se une a la proteína citosólica calmodulina (CaM) para formar un complejo que activa a la MLCK, que a su vez fosforila a MLC20. Con MLC20 fosforilada se activa el mecanismo de la contracción muscular, que incluso puede ser sostenida, aunque disminuya la concentración de Ca^{2+} intracelular o se presente una disminución en la fosforilación de MLC20, puesto que cuando se lleva a cabo la desfosforilación de MLC20 después de la unión de la miosina a la actina, la contracción muscular continua, pero a un ritmo más lento, ya que la miosina se separa de la actina (Deng, M. *et. al*, 2011).

La regulación de la actividad de MLCK y de MLCP pueden darse por varias proteínas cinasas, tales como la proteína cinasa A (PKA por sus siglas en inglés *Protein Kinase A*), la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés *Protein Kinase C*) y Rho cinasa (RhoK por sus siglas en inglés *Rho Kinase*), que regulan indirectamente la actividad del aparato contráctil (Figura 12). De igual manera, proteínas asociadas al filamento delgado de la actina como caldesmona y calponina, pueden modular la interacción de actina-miosina (Deng, M. *et. al*, 2011).

La contracción muscular de las vías aéreas puede ser inhibida por agonistas externos que actúan río arriba de la señal de liberación de Ca^{2+} , disminuyendo la estimulación del ion a la apertura de los canales de almacenamiento de Ca^{2+} que se encuentran en el retículo sarcoplásmico. Los agonistas también pueden actuar río abajo de la señal de liberación de Ca^{2+} , induciendo la disminución de la sensibilidad a

Ca²⁺. Por ejemplo, los β2-agonistas actúan sobre los receptores β2-adrenérgicos que están acoplados a la proteína Gs asociada con adenilatociclasa, donde la presencia de cAMP (por sus siglas en inglés *Adenosin Monophosphate ciclic*) activa a la PKA que inhibe a la PLC y, por lo tanto, al Ca²⁺ inducido por IP3, inhibiendo también, la activación de MLCK y la fosforilación de MLC20 propiciado la relajación (Deng, M. *et. al*, 2011).

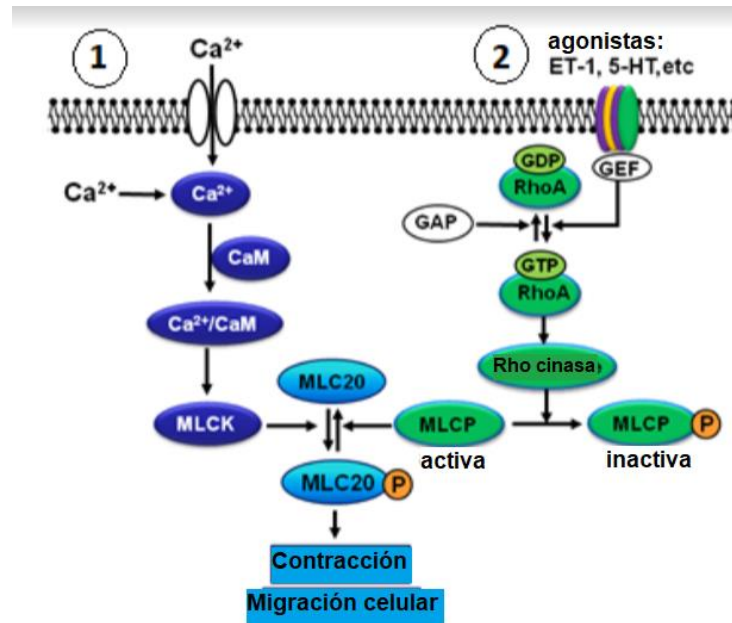


Figura 12. Mecanismo de fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina 20 (MLC20) en la contracción del músculo liso, vía Ca²⁺ y Rho cinasa. (1) Aumento en la concentración de Ca²⁺ genera interacción con CaM, dicho complejo (Ca²⁺/CaM) activa a MLCK que fosforila a MLC20 para que se lleve a cabo la contracción. (2) Estimulación de agonistas que activan a la RhoA que a su vez activa a la cinasa de Rho. Finalmente, Rho inactiva a MLCP que a su vez activa MLC20 y con ello se termina con la contracción del músculo. Tomado de *Deng et, al 2011*.

RELACIÓN DE LA SENSIBILIZACIÓN AL CALCIO CON LA HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

La estimulación de la contracción del músculo liso es comúnmente desencadenada por una serie de eventos intracelulares, que culminan en un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular y / o un aumento en la sensibilización al Ca²⁺ para estimular la fuerza de contracción (Sanderson M. *et. al*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la contracción de las vías aéreas está fundamentalmente regulada por dos enzimas, MLCK y MLCP. La actividad de ambas

enzimas determina el estado de fosforilación y desfosforilación de la MLC y por lo tanto regula el estado de la contracción (Sanderson M. *et. al*, 2008) (Figura 13).

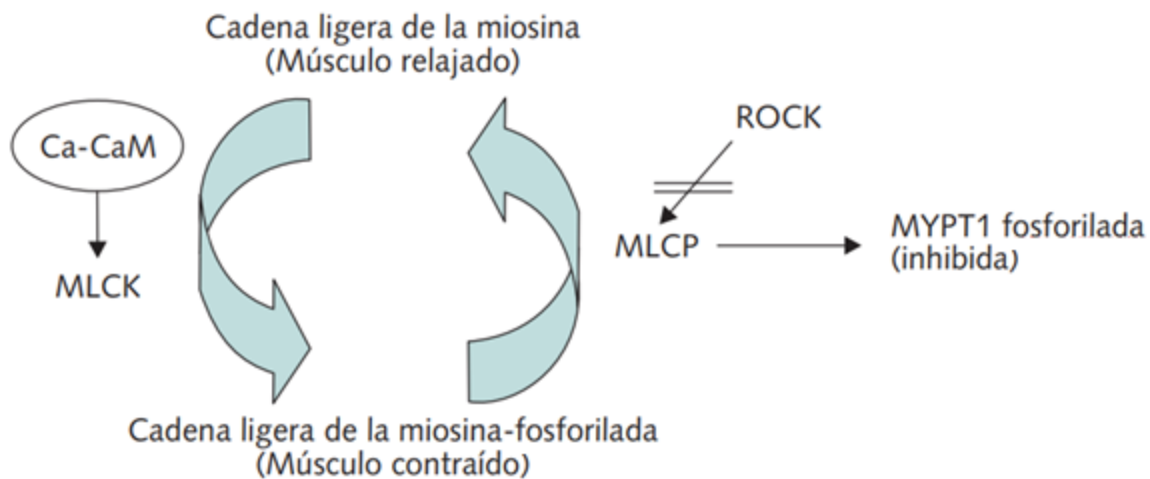


Figura 13. Inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina por la cinasa de Rho. Aumento del Ca^{2+} intracelular que modifica la estructura de la calmodulina (Ca-CaM) y ésta a su vez activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que fosforila a la cadena ligera de la miosina. La MLCP es inhibida por la cinasa de Rho (ROCK) que la fosforila en su subunidad reguladora (MYPT1). Imagen tomada de Sommer and Carvajal, 2009.

La MLCP también conocida por su gen PPP1R12A, está conformada por tres subunidades: una subunidad catalítica de 37 KDa conocida como PP1 (por sus siglas en inglés *Phosphatase 1*), una subunidad pequeña conocida como M20 y la subunidad de unión a la cadena ligera de la miosina de 130 KDa conocida como MYPT1 (por sus siglas en inglés *Myosin Phosphatase Target 1*) (Figura 14), siendo esta última subunidad reguladora, el punto de regulación de la fosfatasa (Bruce M. and Bruce A., 2009).

Varios agonistas/hormonas aumentan el grado de fosforilación de la MLC del músculo liso de las vías aéreas mediante la activación simultánea de la MLCK por parte del aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y la sensibilización al calcio. Dicha sensibilización al Ca^{2+} mantiene la contracción a pesar de la disminución de Ca^{2+} intracelular debido a la inactivación de la MLCP, principalmente por la inhibición de su subunidad reguladora MYPT1, esto a través de una cascada de transmisión de señales, en la que participa la proteína G monomérica RhoA y su efector Rho cinasa/ROCK (Meng S., Page R. and Wolfgang P., 2012). Lo anterior

provoca una desregulación en la desfosforilación de la miosina, permitiendo que la contracción se mantenga, independientemente de los niveles en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, es decir, aunque las concentraciones de Ca^{2+} intracelular disminuyan, la fuerza de contracción del músculo liso de las vías aéreas continua (Hilgers R. and Weeb R., 2005).

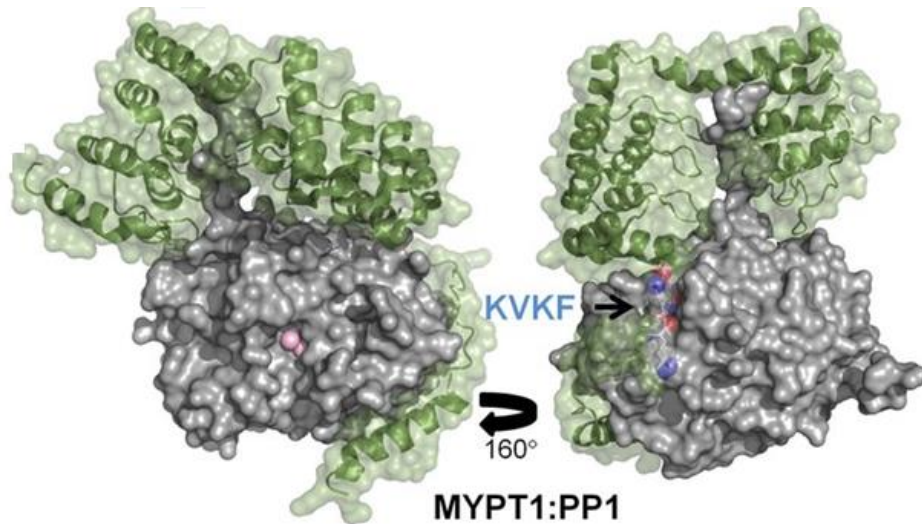


Figura 14. Estructura de la MLCP. Subunidad catalítica PP1 (color gris), subunidad pequeña M20 (color violeta) y subunidad MYPT1 (color verde). Presenta el dominio KVKF, dominio en el cual se da la interacción entre la subunidad PP1 y MYPT1. Imagen tomada de Meng S. et al, 2012.

Rho es una proteína G monomérica citoplasmática y la principal activadora de ROCK, la cinasa encargada de la regulación de MYPT1. A su vez, la actividad de Rho es regulada por inhibidores de la disociación de guanina (GDI), factores de intercambio de guanina (GEF) y proteínas activadoras de GTP-asa (GAP), siendo la unión de Rho a GDI y GDP, lo que la mantienen inactiva y posicionada en el citoplasma. Los GEF activarán a Rho al promover el intercambio de GDP por GTP; mientras que las GAP inducirán su inactivación (Figura 15) (Amano, M. et. al, 2010).

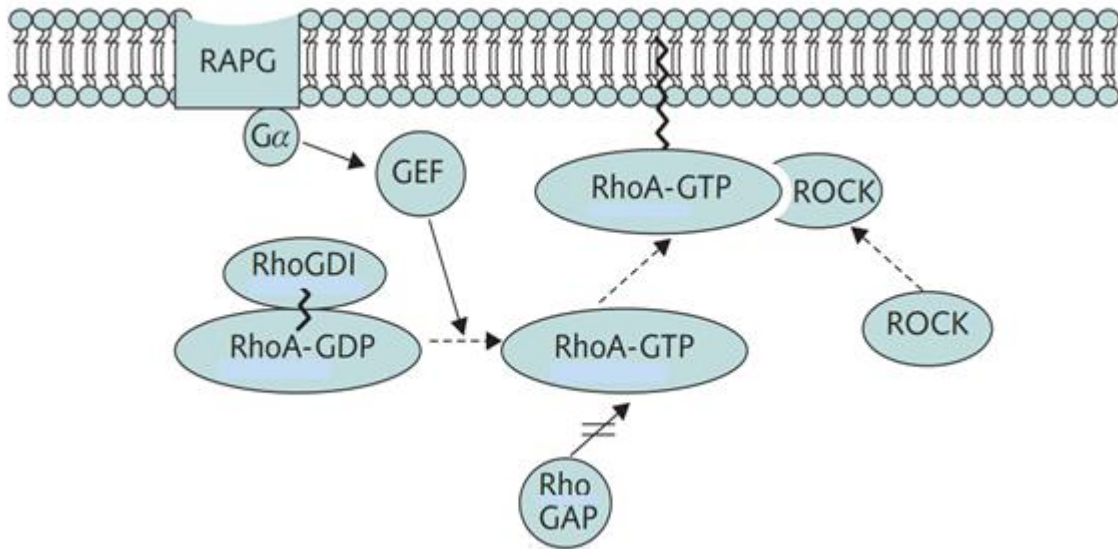


Figura 15. Vía de señalización Rho/ROCK. Rho está en el citoplasma unida al inhibidor de la disociación de guanina (RhoGDI) que la mantiene en su estado GDP (inactiva). Los factores de intercambio de guanina (GEF) promueven la separación de GDI y el intercambio de GDP por GTP (activa). Rho-GTP regresa a Rho-GDP por la desfosforilación realizada por la proteína activadora de GTPasa (GAP). Imagen tomada de *Sommer and Carvajal, 2009*.

Cuando Rho se encuentra unida a GTP, se traslada a la membrana donde activa a la cinasa ROCK (Figura 14) mediante una gran variedad de receptores membranales acoplados a proteínas G, particularmente a las proteínas $G_{12/13}$ a través de la interacción con Rho-GEFs. En el músculo de las vías aéreas, ROCK fosforila a la MLCP, generalmente en las treoninas 696 y/o 853 de la subunidad reguladora MYPT1, lo que impide que la fosfatasa desfosforile a la miosina, permitiendo que la contracción continúe (Figura 16) (Hilgers R. and Weeb R., 2005).

En cuanto a la vía de señalización Rho/ROCK, se ha evidenciado que Rho aumenta en cantidad en el músculo liso bronquial de ratas sometidas a retos antigénicos repetidos, y que la hiperreactividad a la acetilcolina en esos tejidos disminuye en proporción a la inhibición de Rho evidenciando que Rho y su cinasa efectora, ROCK, son protagonistas importantes en la hiperreactividad de las vías aéreas característica del asma. Además, considerando que la mayoría de los receptores que inducen contracción del músculo liso de las vías aéreas están acoplados a proteínas Gq (muscarínicos, histaminérgicos, sustancia P, serotoninérgicos, endotelina, etc.), recientemente se ha propuesto que Rho/ROCK es la vía de señalización intracelular en la que convergen éstos y otros estímulos

generadores de la hiperreactividad de las vías aéreas (Amano, M. *et. al*, 2010, Meng S. *et. al*, 2012).

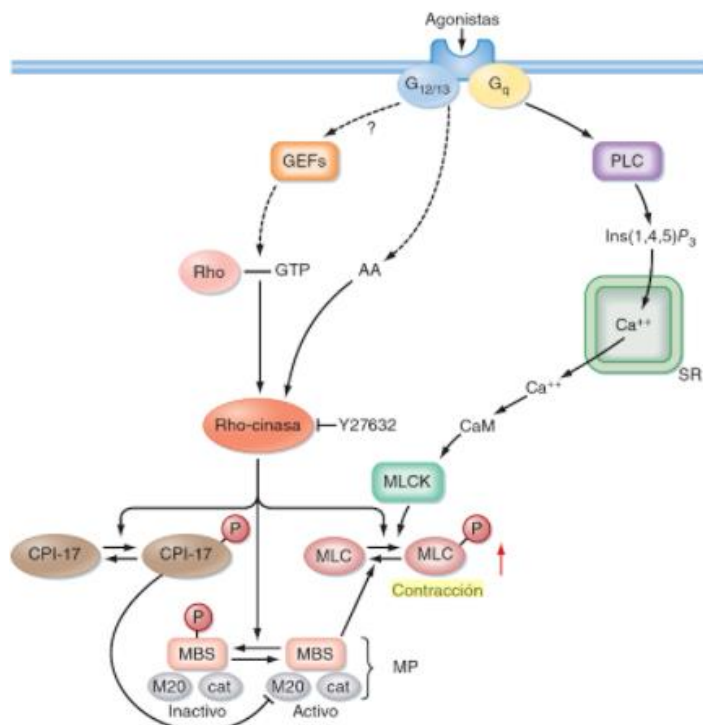


Figura 16. Vía de señalización de RhoA/Rho en músculo liso. Diversos agonistas estimulan la activación de proteínas G, la activación de G_q que desencadena la vía de activación de MLCK dependiente de Ca²⁺ y la activación de G_{12,13} que desencadena la vía de señalización Rho/ROCK. La cinasa RhoA estimula a la Rho cinasa (ROCK) que inhibe a la MLCP, mediante la fosforilación de MYPT1. ROCK también inhibe de forma indirecta a la MLCP mediante la fosforilación/activación de CPI-17, un inhibidor de MLCP de 17 KDa. El efecto neto por parte de ROCK es una reducción de la actividad de la MLCP, que se traduce en un incremento de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y una mayor fuerza de contracción a pesar de la disminución en la concentración del Ca²⁺ intracelular, es decir, una mayor

La hiperreactividad de las vías aéreas en conjunto con la señalización de la vía Rho/ROCK desembocaría directamente en la regulación de MYPT1, ya que la hiperreactividad disminuida y la baja expresión de la actividad de la vía Rho/ROCK aumentaría la actividad de fosfatasa regulada por MYPT1, manteniendo una relajación controlada de la broncoobstrucción de las vías aéreas. Así pues, se tiene como prioridad, la investigación en la regulación de MYPT1 dentro de las principales problemáticas que engloban al asma (Amano, M. *et. al*, 2010, Meng S. *et. al*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

El asma es una de las enfermedades respiratorias con mayor incidencia en todo el mundo. Actualmente existen modelos experimentales que permiten la investigación de la fisiopatología del asma, un ejemplo de ellos es el modelo en cobayo, en el cual se presentan características anatómicas y fisiológicas muy similares a las del ser humano, incluyendo la hiperreactividad de las vías aéreas. La hiperreactividad de las vías aéreas juega quizás, el papel fisiológico más importante ya que induce un incremento en la respuesta exacerbada de la contracción del músculo liso de las vías aéreas que se da durante una crisis asmática. Por lo anterior, la integridad física de los pacientes con asma se ve disminuida, además de que el impacto a nivel social y económico es muy alto.

En la actualidad, no se conoce del todo el mecanismo ni la regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas, ni mucho menos la relación que ocurre entre la hiperreactividad y el incremento exacerbado de la contracción del músculo liso de las vías aéreas. Sin embargo, a nivel celular, la regulación de la maquinaria contráctil de las vías aéreas a nivel proteómico podría regular a su vez el incremento o disminución de la hiperreactividad. En el presente estudio se caracterizará la expresión de la subunidad reguladora de la MLCP, la MYPT1, en el músculo liso de las vías aéreas. Además, se evaluará su relación con el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica.

HIPÓTESIS

El desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas podría estar regulado por la expresión de la MYPT1 en el músculo liso de las vías aéreas en cobayos con modelo de asma alérgica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la hiperreactividad de las vías aéreas podría estar relacionada con la expresión y regulación de la MYPT1 en el músculo liso de las vías aéreas.

Objetivos particulares

1. Evaluar la reactividad de las vías aéreas de cobayos controles y del modelo de asma.
2. Determinar la expresión de MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en músculo traqueal de cobayos del modelo de asma.
3. Evaluar la expresión de MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ de músculo traqueal de cobayos del modelo de asma.
4. Localizar a la proteína MYPT1 y a sus formas fosforiladas MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en diferentes compartimentos subcelulares.
5. Evaluar si hay relación entre la expresión de la MYPT1 con la hiperreactividad de las vías aéreas en cobayos del modelo de asma.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de cepas HsdPoc:DH de Harlan México con pesos que oscilaban entre los 350g-400g de peso, mantenidos en condiciones estables en el bioterio del INER con humedad convencional de 50-70%, temperatura, alimentación, ciclos de luz y oscuridad controlados 12/12, aire filtrado a 21 \pm 1 °C y cama esterilizada. Se alimentaron con alimento para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Los animales se dividieron en dos grupos de seis cobayos cada uno, el primero correspondió al grupo de cobayos control y el segundo al grupo de cobayos del modelo de asma. Este proyecto fue aprobado por el comité Ético y Científico del INER (B37-12, DI/CCB/344/12, 29 de noviembre de 2012).

SENSIBILIZACIÓN ANTIGÉNICA

Se realizó la preparación de una solución de ovoalbúmina (OVA; 0.06 mg/ml, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio como adyuvante (1 mg/ml; J.T. Beker, NJ, EU), disueltos en 30 ml de solución salina fisiológica (SSF). En el día 1, se inyectaron 6 cobayos con 1 ml de la solución de OVA, 0.5 ml vía subdérmica y 0.5 ml vía intraperitoneal, mientras que el grupo de 6 cobayos control fue inyectado con 1ml de SSF (Figura 17).

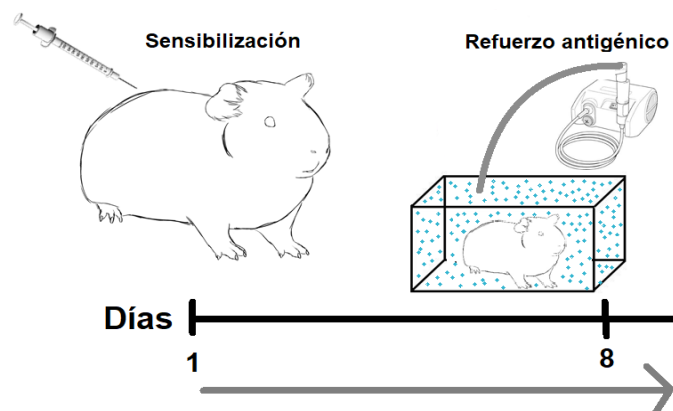


Figura 17. Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*). Sensibilización antigénica con OVA a grupo de cobayos de modelo de asma y con SSF a grupo control. Refuerzo antigénico de cobayos de modelo de asma.

El día 8 se reforzó la sensibilización de los cobayos de modelo de asma (Figura 19; refuerzo antigénico), en una cámara conectada a un nebulizador US-Bennett (flujo de 2ml/min) por el cual se administró la solución de OVA (3 ml/SSF) por 5 minutos. El nebulizador produce una mezcla de partículas distribuidas de la siguiente manera: el 44% es menor a 4 μm de diámetro, el 38% de 4-10 μm y el 18% mayor a 3 μm . Para los siguientes retos antigénicos de los días 15, 25 y 35, se colocó al cobayo dentro de una cámara en donde se registró el índice de broncoobstrucción (iB) basal (Figura 18), con la ayuda de un pletismógrafo barométrico (Figura 19), para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA), mientras que los cobayos control solo recibieron SSF. La cámara fue provista de un flujo de aire continuo (10 ml/s), que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. Posteriormente se les administraron nebulizaciones de 1 minuto con OVA (1 mg/ml), realizando un registro pletismográfico durante una hora para obtener la respuesta de broncoobstrucción máxima.

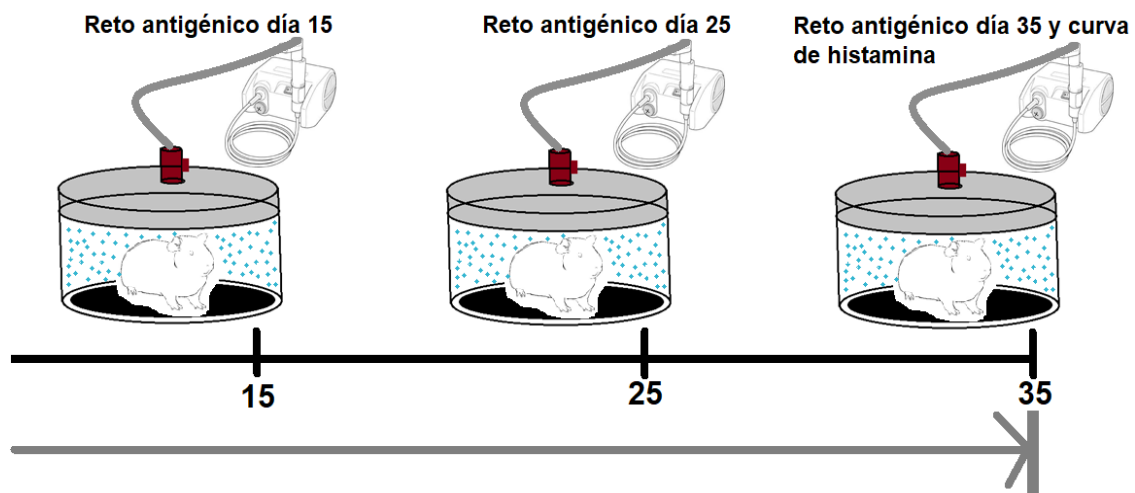


Figura 18. Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*). Retos antigénicos con OVA.

El sistema de pletismografía barométrica se basó en la medición directa de las variaciones de presión que se presentan dentro de la cámara inferior en donde se encuentra el animal (Figura 19) y las compara con una presión de referencia presente en la parte superior de la cámara pletismográfica (Figura 19, coloración grisácea de la parte superior de la cámara pletismográfica). Dichas variaciones se registraron con un

transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym Milpitas, CA, EU) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por el programa Buxco Byosistem XA v1.1, el cual se ajustó para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. Lo anterior, con el fin de no incluir registros ajenos al experimento, tales como los movimientos del cobayo en donde aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada periodo fueron eliminadas debido a ésta causa. Cada valor de \dot{V}_B fue el promedio de 15 s de lecturas, y de éstas, el promedio de los últimos 5 minutos de cada periodo (Álvarez S. M. Dinorah, 2017).

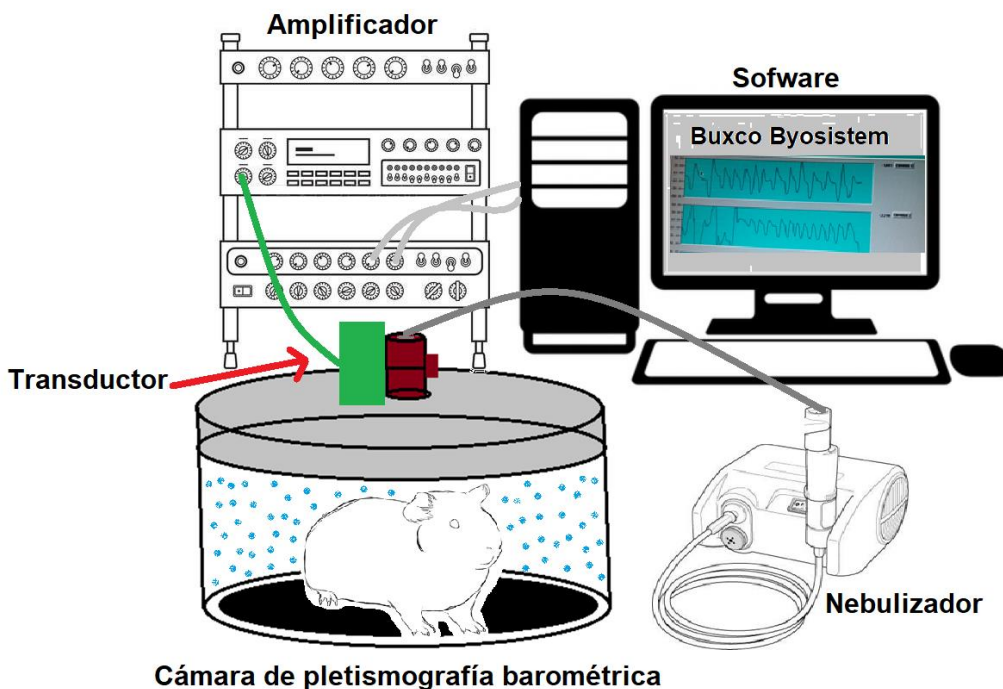


Figura 19. Equipo de pletismografía barométrica. El transductor, el cual mide la diferencia de presiones entre la parte superior de la cámara (1 atmósfera) y la presión dada dentro de la parte superior, en donde se encuentra el cobayo. Dicho transductor, manda la señal hacia el amplificador, el cual, está conectado a la computadora, en donde se lleva a cabo el procesamiento de los datos.

El íB se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y el que está dentro del pulmón del cobayo, debido a que el aire ambiental se calienta de ~25°C a 37°C una vez que está dentro de los pulmones, además de que se humidifica al 100%. Los sensores de la cámara de pletismografía detectan este cambio en el volumen como un aumento transitorio en la presión en el interior de la cámara, pues disminuye conforme el cobayo exhala el aire, ya que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, y durante la exhalación baja el volumen del aire dentro de la cámara y esto se registra como una disminución en la presión. De esta forma, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa de la computadora puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración en el equipo previamente calibrado (Álvarez S. M. Dinorah, 2017, Hamelmann E. S. *et. al*, 1977). La información que se procesa da el valor del íB que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\text{íB} = [(\text{Te}-\text{Tr})/\text{Tr}] [\text{PFE}/\text{PFI}]$$

donde:

Te = Tiempo total espirado (s)

Tr = Tiempo total de relajación (s)

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

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

REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

En el reto correspondiente al día 35, se llevó a cabo la evaluación de la reactividad de las vías aéreas, mediante la comparación de la curvas dosis-respuesta antes y después del reto antigénico con OVA. Primeramente, se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron dosis crecientes de histamina como agonista constrictor de las vías aéreas (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma St. Louis, EU) durante 1 min, tanto para el grupo de modelo de asma, como para el grupo control. Para cada dosis se registró el íB durante 5 min continuos, obteniendo el promedio final. La curva dosis-respuesta se determinó una vez que la histamina produjo una broncoobstrcción que

triplicó el valor basal del íB (Dosis provocativa 200 o PD₂₀₀). Después se esperó a que el íB disminuyera aproximadamente el 50% de su valor basal. Ambos grupos experimentales fueron retados con OVA (0.5 mg/mL SSF, 1 min). Tres horas después del reto con OVA, se realizó la segunda curva de histamina con el mismo protocolo que en la primera curva (Álvarez S. M. Dinorah, 2017).

EUTANASIA DE ANIMALES

Veinticuatro horas después de la realización de la curva de histamina, los cobayos se sometieron a la eutanasia por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico (28 mg/Kg). Los cobayos cayeron en paro cardiorrespiratorio, lo que permitió seguir con la disección. Se extrajo el músculo liso de la tráquea, el cual fue almacenado en solución de inhibidor de proteasas (Cocktail Tablets cOmplete, Roche) para el análisis de electroforesis, en formalina para el análisis de inmunohistoquímica y sin solución sometido a secado en temperatura ambiente para el proceso de PCR.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La tráquea fue fijada en solución amortiguadora de formalina al 10% y posteriormente se incluyó en parafina. Secciones de 3 µm se desparafinaron a 55°C durante 20 min y se rehidrataron en alcoholes graduados pasando primero por xileno hasta alcohol al 70% y finalmente con agua destilada, cada paso tuvo una duración de 10 min. La recuperación antigénica se hizo con buffer de citratos 10 mM a pH=6 por 5 min en el horno de microondas. Las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno (3%), con el fin de bloquear a la peroxidasa endógena. Los sitios no específicos fueron bloqueados con suero de caballo al 2%. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-MYPT1 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA). Para detectar la unión específica de los anticuerpos primarios se usó un Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector laboratorios, USA), en el cual los tejidos fueron secuencialmente incubados con suero bloqueador, anticuerpo secundario específico y un complejo peroxidasa/estreptoavidina. Finalmente se usó 3,3'-diaminibenzidina (Bio-Rad, USA) como cromógeno revelador. Las secciones

fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer. Las laminillas fueron lavadas dos veces con TBS-T durante cada proceso. Como control de unión no específica del anticuerpo secundario, secciones de la misma tráquea fueron procesadas sin el anticuerpo primario.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La muestra de músculo liso fue sometida al procedimiento de precipitación y cuantificación de las proteínas presentes en miocitos traqueales de cobayo. El músculo liso previamente embebido en solución de inhibidores de proteasas (Cocktail Tablets cOplete, Roche) fue homogenizado (PRO200; Pro Scientific Inc., Oxford, CT, USA) en buffer de fosfatos (PO_4 6.7 mM a un pH de 7.4 con KCL 0.04 M y MgCl_2 1 mM) a 4 °C y sonicado tres veces a 30 U de amplitud por 30 segundos con intervalos de 1 min en hielo (Vibra-cell 75185; Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA). La suspensión se desalinizó y precipitó a -20°C en una solución que tenía acetona, 10% de TCA (T6399, SIGMA, USA) y 20 mM de ditioneol (DTT, Roche Diagnostics GmbH). Los botones celulares fueron resuspendidos en buffer de fosfatos a 4 °C. La cuantificación de proteínas fue determinada con el Kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las muestras finales fueron almacenadas a 70°C.

Para la electroforesis de una dimensión (1D), se utilizaron geles preparados en condiciones reductoras con 2.5% de 2-mercaptoetanol y reactivos sugeridos por Laemmli (1970). Las proteínas fueron cargadas (30 μ /carril) y separadas con un mini-sistema comercial (Mini-Protean II; Bio-Rad) usando 10% de acrilamida/bis acrilamida (30% T, 2.67 C) a 80 V para concentración y 120 V para separación, usando un Power pack 3000 (Bi-Rad). La electroforesis de 1D incluyó marcadores de peso molecular comerciales (Precision Plus Protein All Blue; Bio-Rad) y los geles usados para transferir las proteínas a membranas de PVDF incluyó un marcador de peso molecular estándar (Precision Plus Protein™ WesternC Standards; Bio-Rad). Después de la separación electroforética, se usó una placa (GE Healthcare Bio-Sciences AB) para retirar los geles de la placa de acetato y mediante una cámara húmeda (XCell SureLock™ Mini-Cell Device) dentro de XCell II™ Blot Module, y NuPAGE Transfer Buffer con NuPAGE Antioxidant por 1h a 30 V, las proteínas fueron transferidas a

membranas PVDF. Finalmente, las proteínas transferidas a PVDF fueron analizadas mediante inmunoelectroforesis.

Para la electroforesis de dos dimensiones (2D), se preparó una solución de hidratación para cada una de las muestras a cargar (Urea 7M, Tiurea 2M, Chaps 4%, DTT 60 mM, Azul bromofenol y Anfolitos pH 3-10). La concentración a cargar de cada muestra fue de 150 µg. Todo lo anterior fue aforado a 125 µL y cargado en tiras (ReadyStrip™ IPG Strips; Bio-Rad) con aceite mineral, hidratando a temperatura ambiente 25-27°C por un máximo de 16 hrs. Seguidamente, las tiras fueron corridas en un equipo de isoelectroenfoque (PROTEAN IEF Cell; Bio-Rad) con método “70CMEXTRACT”, a tres pasos: 250 mV voltaje lineal por 20 min, 4000 V voltaje lineal por 2 hrs y 4000V hasta alcanzar 10,000 V/hr en pendiente rápida, con amperaje de 50 mA por tira, usando puentes Electrode Wicks (PROTEAN^R IEF System; Bio-Rad). Terminado lo anterior, las tiras fueron sometidas a 15 min en solución de equilibrio con DTT (1.5 M Tris pH=8.8, Urea 6M, Glicerol 87%, SDS 2%, Azul bromofenol, DTT 60 mM) y a 15 min subsecuentes en solución de equilibrio con Iodoacetamida (1.5 M Tris pH=8.8, Urea 6M, Glicerol 87%, SDS 2%, Azul bromofenol, Iodacetamide). Finalmente, las proteínas fueron analizadas mediante inmunoelectroforesis.

INMUNOELECTROFORESIS

La inmunoelectroforesis fue realizada con membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) siguiendo instrucciones de manufacturación. Después de transferir, las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Para el reconocimiento de MYPT1, MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) se utilizó una dilución de 1:500, incubando los anticuerpos primarios a 37°C por 1h. Se lavaron las membranas con TBS-T por 5 min, 5 veces. Posteriormente se incubaron las membranas por 1 h a 37°C con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo diluido 1:1000 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA). Después, las membranas se lavaron con TBS-T por 5 min, 5 veces. El ensayo de quimioluminiscencia fue

realizado con 20X LumiGLO (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA). Después de cada reacción, las membranas PVDF fueron desnudadas a temperatura ambiente. Finalmente, para realizar el análisis de densitometría, todos los ensayos fueron estandarizados con la enzima GADPH.

EXTRACCIÓN DE RNA

Una vez obtenido el músculo liso traqueal, se dejó secar para obtener su peso total. Por cada 50 mg de muestra se agregó 1 mL de trizol, homogenizándose en hielo. Por cada mL de trizol, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C. En tubos cónicos tipo eppendorf nuevos, se agregaron 500 μ L de isopropanol por cada mL de trizol. En estos tubos se agregó la primera fase de lo obtenido en la centrifuga que corresponde al RNA. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 11 min a 4°C. Se desechó el isopropanol y se agregó 1 mL de etanol por cada 1 mL de trizol. Se centrifugó a 7500 rpm por 6 min a 4°C. Se decantó el etanol, y se dejó evaporar por 10 min el etanol que quedó sobre las paredes del tubo. Se agregaron 10 μ L de agua libre de RNAsas y se mantuvo en hielo para su posterior cuantificación.

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Una vez que se cuantificó el RNA, se evaluó su calidad mediante la resolución en geles de agarosa al 1% y por la medición de la relación de absorbancia 260/280 nm. 1 μ g de RNA total se transcribió de forma reversa. Se realizó el paso de purificación del RNA mediante tratamiento con DNAsa para eliminar el DNA genómico e impurezas que hubieran podido quedar tras la extracción del RNA. Para la realización del proceso de transcripción reversa se utilizaron reactivos de EDTA (FERMENTAS, Waltham, Massachusetts), buffer RT 10x, dNTP's 25x, iniciadores al azar 10X, inhibidor RNAsa y transcriptasa reversa (High-Capacity cDNA reverse Transcription Kits with RNasa Inhibitor, Applied Biosystems, Grand Island, NY) de acuerdo a las instrucciones de manufacturación. La amplificación de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando un equipo i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). La PCR se

efectuó con una mezcla de trabajo de cDNA en un volumen de reacción de 15 μ L conteniendo 2 μ L de cDNA, MgCl₂ 50 mM, buffer MgCl₂ 10x, dNTP's 2 mM, 10 μ M de iniciadores específicos 5' y 3', 0.15 μ L Taq DNA (Invitrogen, Grand Island, NY), y 10 nM de fluoresceína y tinción SYBR Green I diluida 1:50, 000 (Roche, Indianápolis, IN). Un oligonucleótido para el gen MYPT1 sentido: GCGGCAGGAGAGGGGA y un segundo oligonucleótido MYPT1 anti-sentido: ACTCTGATCAAGGCCCCATT. Todas las PCRs se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como $2^{-\Delta CT}$, en donde la ΔCT se obtuvo CTMYPT1- CTPoIRIIA. La prueba estadística realizada fue *t* de Student no pareada.

ANÁLISIS *IN SILICO* DE SECUENCIAS DE MYPT1 DE COBAYO

Se realizó el análisis *in silico* de la secuencia de MYPT1 de cobayo. Para ello se descargó la secuencia de interés blanco de la base de datos de UniProt. Se trabajó con la secuencia que tiene el único identificador de entrada H0V275_CAVPO. Para predecir las modificaciones post-traduccionales potenciales de la MYPT1 de cobayo, la secuencia se ingresó a FindMod tool. Las modificaciones post-traduccionales que se evalúan mediante esta herramienta son acetilaciones, glicosilaciones, fosforilaciones, miristoilación y SUMOilación. Por otro lado, la misma secuencia se ingresó a NucPred para evaluar si la secuencia posee péptidos de reconocimiento para la entrada a núcleo.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS

Una vez obtenido el músculo liso traqueal, se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido, previamente lavado con PBS y secado para eliminar el exceso de líquido. El músculo liso fue disgregado por medio de criofragmentación. Se procedió a agregar el buffer de extracción de citoplasma e inhibidores de proteasas (CEB, Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA) previamente enfriado. Después de homogenizar la muestra, se agregó el Pierce Tissues Strainer (Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA) y se centrifugó a 500 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante (extracto citoplasmático)

y se almacenó en un tubo nuevo. Al botón celular, se le adicionó el buffer de extracción de membrana (MEB, Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA), se agitó en un homogeneizador vortex durante 5 s y se incubó a 4°C en agitación suave durante 10 min. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se transfirió el sobrenadante (extracto de membrana) a un tubo nuevo. Al botón celular obtenido, se le adicionó el buffer de extracción nuclear (NEB, Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA) y se agitó en vortex durante 15 s, incubándolo después a 4°C en agitación suave durante 30 min. Después de la incubación, se centrifugó la muestra a 5000 rpm por 5 min, se retiró nuevamente el sobrenadante (extracto nuclear soluble), almacenándolo en un tubo nuevo. Al botón celular se le agregó nuevamente buffer de extracción nuclear con inhibidores de proteasas y el tampón de extracción de unión a la cromatina compuesto por CaCl₂ y nucleasa mitocondrial (Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA), se vortexeo durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente, se vortexeo de nuevo la muestra durante 15 s y se centrifugó a 16,000 rpm por 5 min, colocando el sobrenadante (extracto nuclear unido a la cromatina) en un tubo nuevo. Al botón celular se le adicionó el buffer de extracción de pellet (PEB, Subcellular Protein Fractionation kit, Thermo Scientific for Tissues, Rockford USA) con inhibidores de proteasas, agitando la muestra en vortex durante 15 s e incubándola por 10 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo se centrifugó la muestra a 16,000 rpm durante 5 min y se colocó el sobrenadante (extracto del citoesqueleto) en un tubo nuevo. Finalmente, se realizó un Western blot de 1D para los extractos obtenidos de citoesqueleto, membrana plasmática, núcleo, cromatina y citoplasma con un anticuerpo policlonal específico para MYPT1, anti-MYPT1 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) y anticuerpos policlonales específicos para la identificación de las fosforilaciones de MYPT1, anti-MYPT1 Ser507 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), anti-MYPT1 Ser668 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), anti-MYPT1 Thr696 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) y anti-MYPT1 Thr853 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA).

MATERIALES

Ovoalbúmina (chicken egg albumin) grado II fue comprado de Sigma Chemical Co. (US). El hidróxido de aluminio fue comprado de J.T. Baker, US. El pentobarbital sódico fue adquirido de Pfizer, México.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La hiperreactividad a la histamina de las vías aéreas fue evaluada por el promedio de la dosis provocativa 200% (DP_{200}), obtenido a partir del valor de la DP_{200} después del reto con la DP_{200} obtenido antes del reto. El cambio en la reactividad de la histamina inducida por reto antigénico fue evaluado por el cociente de DP_{200} . La comparación entre los grupos control y modelo de asma fue evaluado por las medias mediante la prueba de *t* Student no pareada. Las relaciones entre dos variables independientes fueron evaluadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La significancia estadística fue asignada como $P < 0.05$ a dos colas. Los datos en el texto y figuras están expresados como media \pm error estándar.

RESULTADOS

1. Reactividad de las vías aéreas en cobayos de modelo de asma.

Se evaluó la reactividad de las vías aéreas por medio de la administración de histamina antes y después del reto antigénico con OVA. Mediante el análisis de los valores del promedio de la dosis provocativa 200% en animales pertenecientes al modelo de asma, se observó una disminución de la PD₂₀₀ después del reto antigénico en comparación con el valor de la PD₂₀₀ antes del reto. Por otro lado, los valores correspondientes a la PD₂₀₀ antes y después del reto antigénico de los animales del grupo control no presentan cambios estadísticamente significativos. Por todo lo anterior, podemos concluir que los animales del modelo de asma son hiperreactores en comparación con los animales del grupo control (Figura 20).

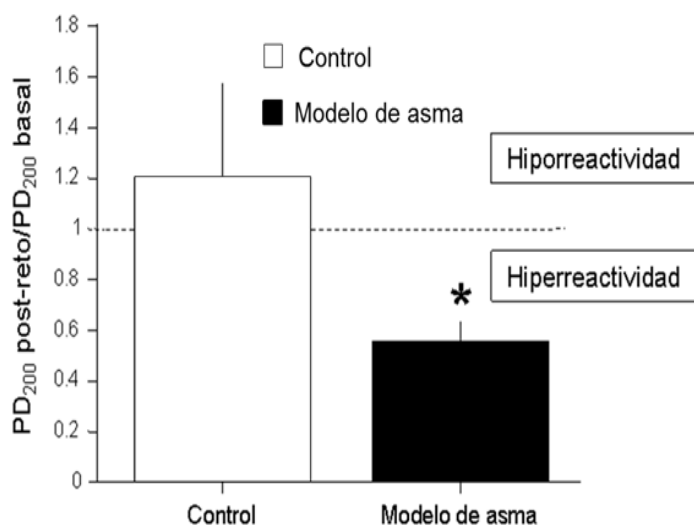


Figura 20. Hiperreactividad de las vías aéreas inducida por reto antigénico con OVA en cobayos del modelo de asma. Cociente del valor de la PD₂₀₀ en respuesta a la histamina antes del reto antigénico, sobre el valor de la PD₂₀₀ en respuesta a la histamina después del reto antigénico. La línea discontinua corresponde al límite entre los valores de hiperreactividad e hiporreactividad. Las barras corresponden al análisis del promedio ± el error estándar de $n=6$ cobayos para el grupo control (barra blanca) y $n=6$ cobayos para el grupo del modelo de asma (barra negra); * $P<0.05$, prueba no pareada, t Student.

2. Evaluación de la expresión y localización celular de MYPT1 en la tráquea de cobayos del modelo de asma mediante inmunohistoquímica.

Se realizaron pruebas de inmunohistoquímica en cortes de tráquea que fueron incubados con un anticuerpo específico contra MYPT1 para evaluar la diferencia de marcaje entre los grupos experimental y control. La marca positiva para MYPT1 se observa en color café y se indica con un asterisco. El análisis en los cortes histológicos en aumentos de 10x, 40x y 100x mostró que la marca de MYPT1 se distribuye de forma uniforme sobre la banda correspondiente al músculo liso traqueal en el grupo de cobayos con modelo de asma. La marca positiva para MYPT1 no se observa en cortes histológicos de animales del grupo control (Figura 21).

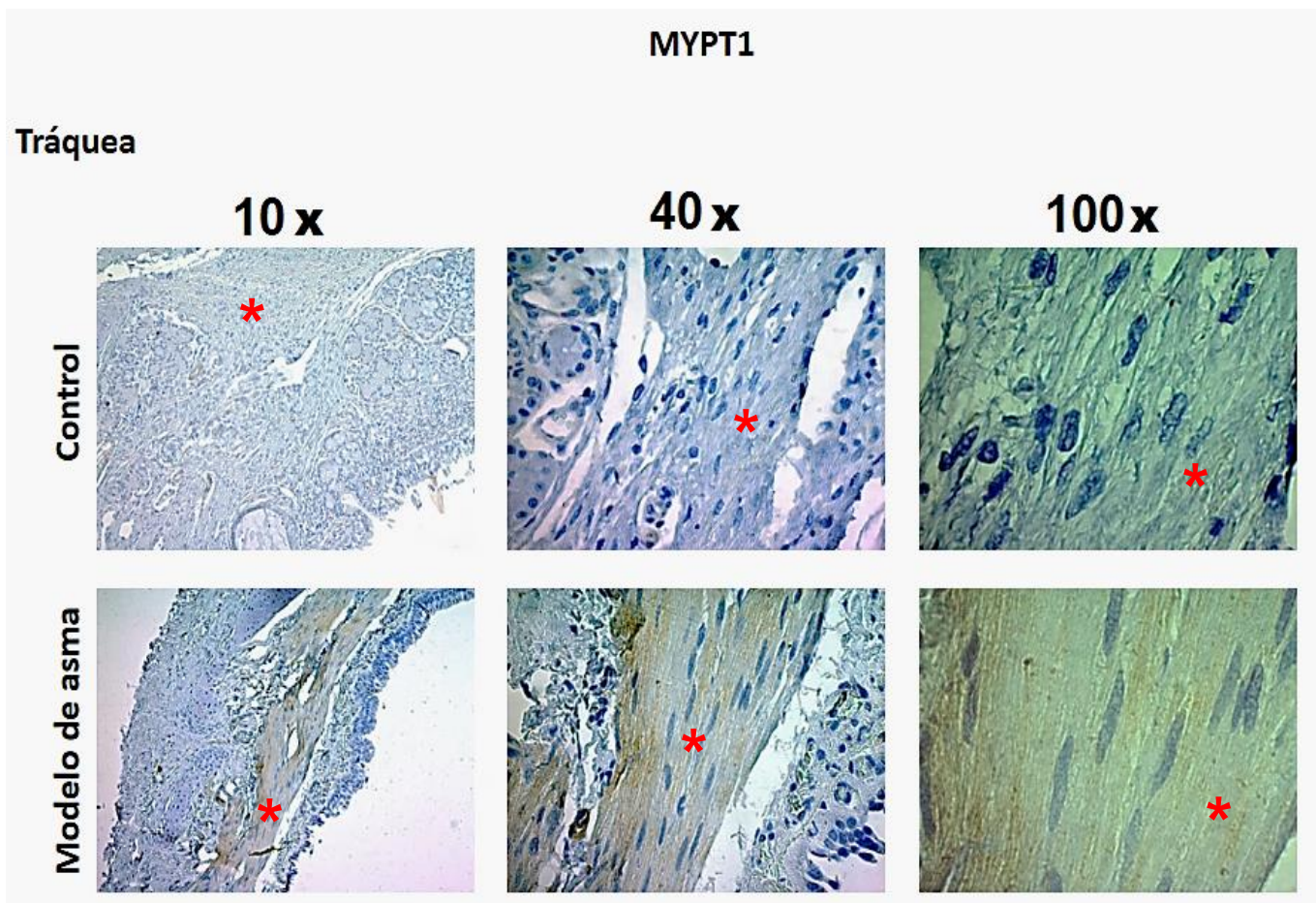


Figura 21. Marca positiva para MYPT1 en músculo liso traqueal en cobayos del modelo de asma. En aumentos de 10x, 40x y 100x se observa marca positiva en color café para MYPT1 sobre la banda del músculo liso traqueal en cobayos del modelo de asma. En cobayos controles no se observa marca positiva para MYPT1. El asterisco indica la localización de la banda del músculo liso traqueal.

3. Expresión del mRNA de MYPT1 (*PPP1R12A*) en músculo traqueal de cobayo.

Se evaluó la expresión de la MYPT1 a nivel génico con *PPP1R12A* en el músculo liso traqueal de cobayos del modelo de asma y cobayos controles. Por medio de RT-PCR cuantitativa, se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de MYPT1 en el músculo liso traqueal de cobayos del modelo de asma en comparación con la expresión en cobayos controles ($P < 0.001$; $n = 6$ cobayos por grupo) (Figura 22).

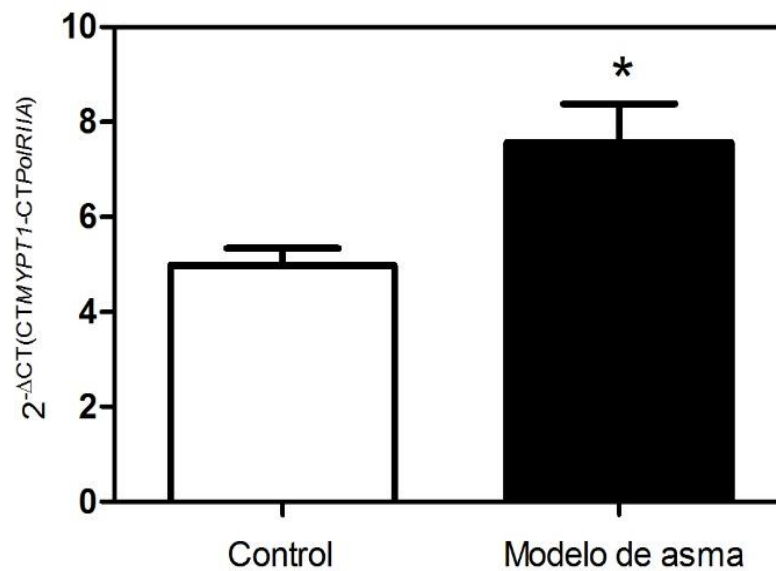
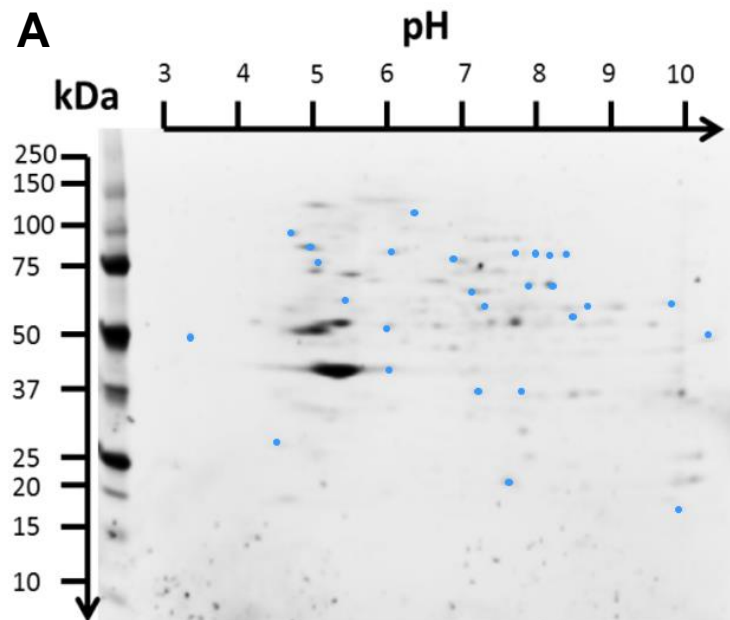


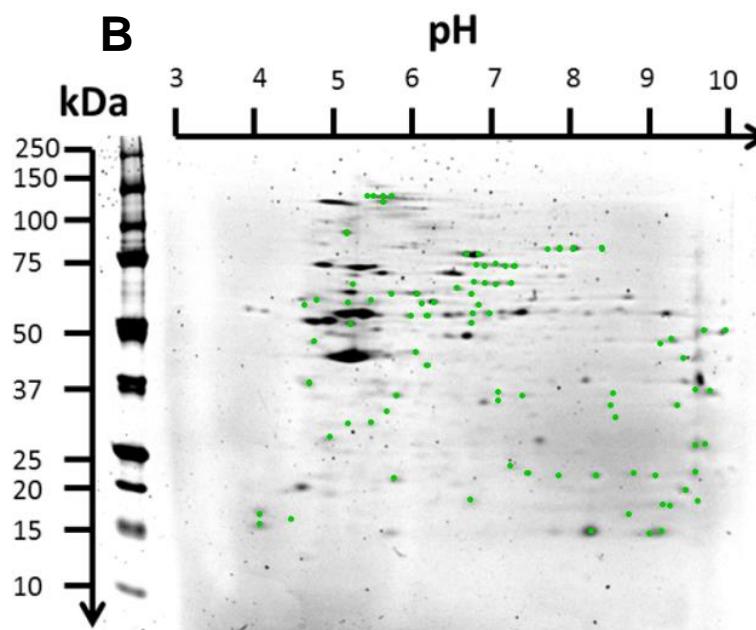
Figura 22. Expresión de mRNA de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos. Las barras corresponden al promedio de la RT-PCR cuantitativa \pm el error estándar de cobayos del modelo de asma (barra oscura) y cobayos control (barra blanca), $n = 6$ cobayos por grupo. * $P < 0.001$. Prueba estadística *t* Student no pareada.

4. Análisis del mapa proteómico de músculo liso traqueal de cobayos con modelo de asma y controles.

Se realizó la extracción, precipitación y cuantificación de proteínas del músculo liso de la tráquea y se sometió a una electroforesis de doble dimensión (2D) usando un rango de pH de 3 a 10. Al término de la electroforesis en 2D, los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby para determinar la presencia de las proteínas que conformarían el mapa proteómico de miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma y de cobayos controles. En los mapas proteómicos pertenecientes a los cobayos del modelo de asma se presenta la expresión de proteínas que no se encuentran en los mapas proteómicos de los cobayos controles, tal y como se muestra en la Figura 23A, en donde se observan 27 puntos en color azul que indican la presencia de proteínas expresadas en cobayos de modelo de asma y que no se expresan en cobayos controles. En la Figura 23B, se observan 85 puntos en color verde que indican la expresión de proteínas presentes en cobayos controles y ausentes en cobayos del modelo de asma. De igual forma, se observa un aumento o disminución de la expresión de ciertos puntos que coinciden en ambos grupos. En la Figura 24A y 24B, se identificaron 18 puntos rotulados en color rosa, que indican proteínas que disminuyen su expresión en cobayos de modelo de asma comparándolas con las expresadas en los cobayos controles. Del mismo modo, la Figura 25A y 25B muestra 1 punto en color naranja que aumenta su expresión en cobayos de modelo de asma en comparación con los cobayos controles. Finalmente se presentan proteínas que coinciden en ambos grupos que no aumentan ni disminuyen su expresión. En la Figura 26A, se cuentan 28 puntos en color rojo presentes en cobayos del modelo de asma que coinciden también en cobayos controles, mientras que la Figura 26B, muestra 31 puntos también en color rojo, presentes en el grupo control que coinciden con el grupo del modelo de asma.

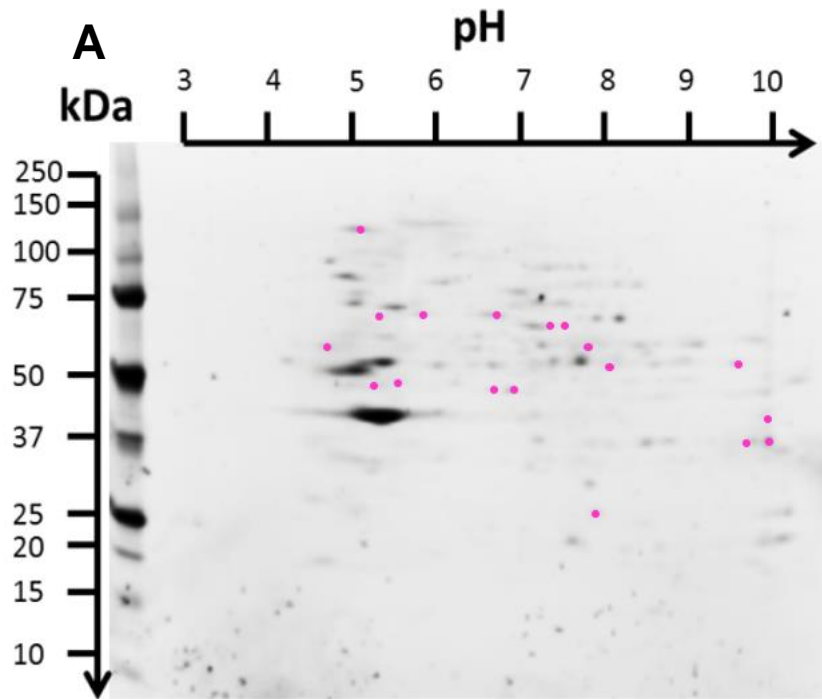


Modelo de asma

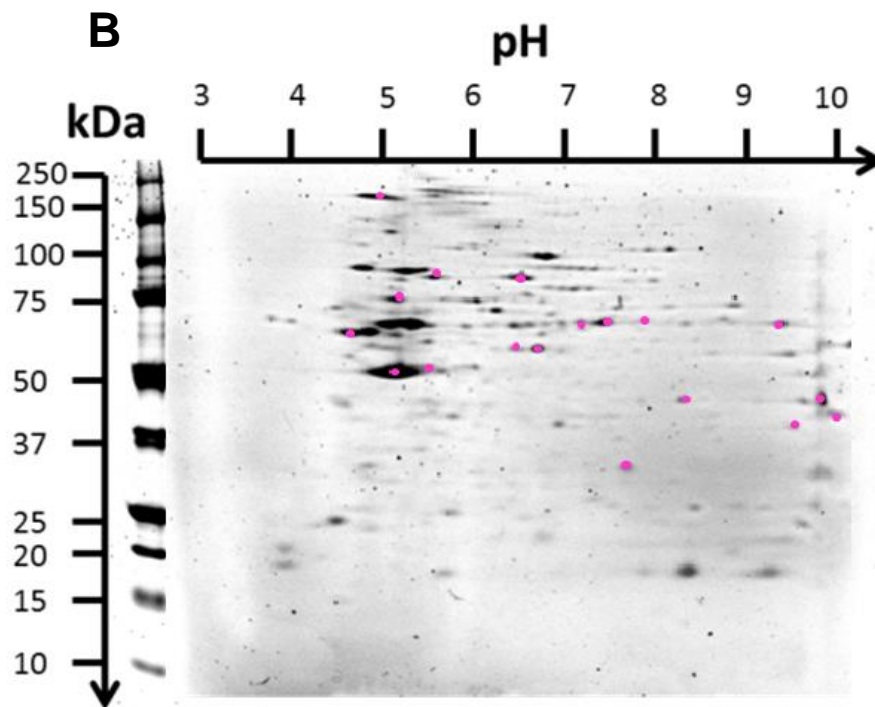


CONTROL

Figura 23. Mapa proteómico de micocitos traqueales de cobayo. A) Expresión de proteínas presentes en cobayos modelo de asma ausentes en controles (27 puntos color azul). B) Expresión de proteínas presentes en cobayos controles y ausentes en modelo de asma (85 puntos color verde). Electroforesis de doble dimensión (2D), cada gel cargado con 200 µg de proteína total cuantificada previamente. Tinción con SYPRO Ruby.



MODELO DE ASMA



CONTROL

Figura 24. Mapa proteómico de micocitos traqueales de cobayo. A) Expresión de proteínas que disminuyen su expresión en animales de modelo de asma comparado con el control (18 puntos color rosa). B) Expresión de proteínas que aumentan su expresión en animales del grupo control comparado con el grupo control (18 puntos color rosa). Electroforesis de doble dimensión (2D), cada gel cargado con 200 μ g de proteína total cuantificada previamente. Tinción con SYPRO Ruby.

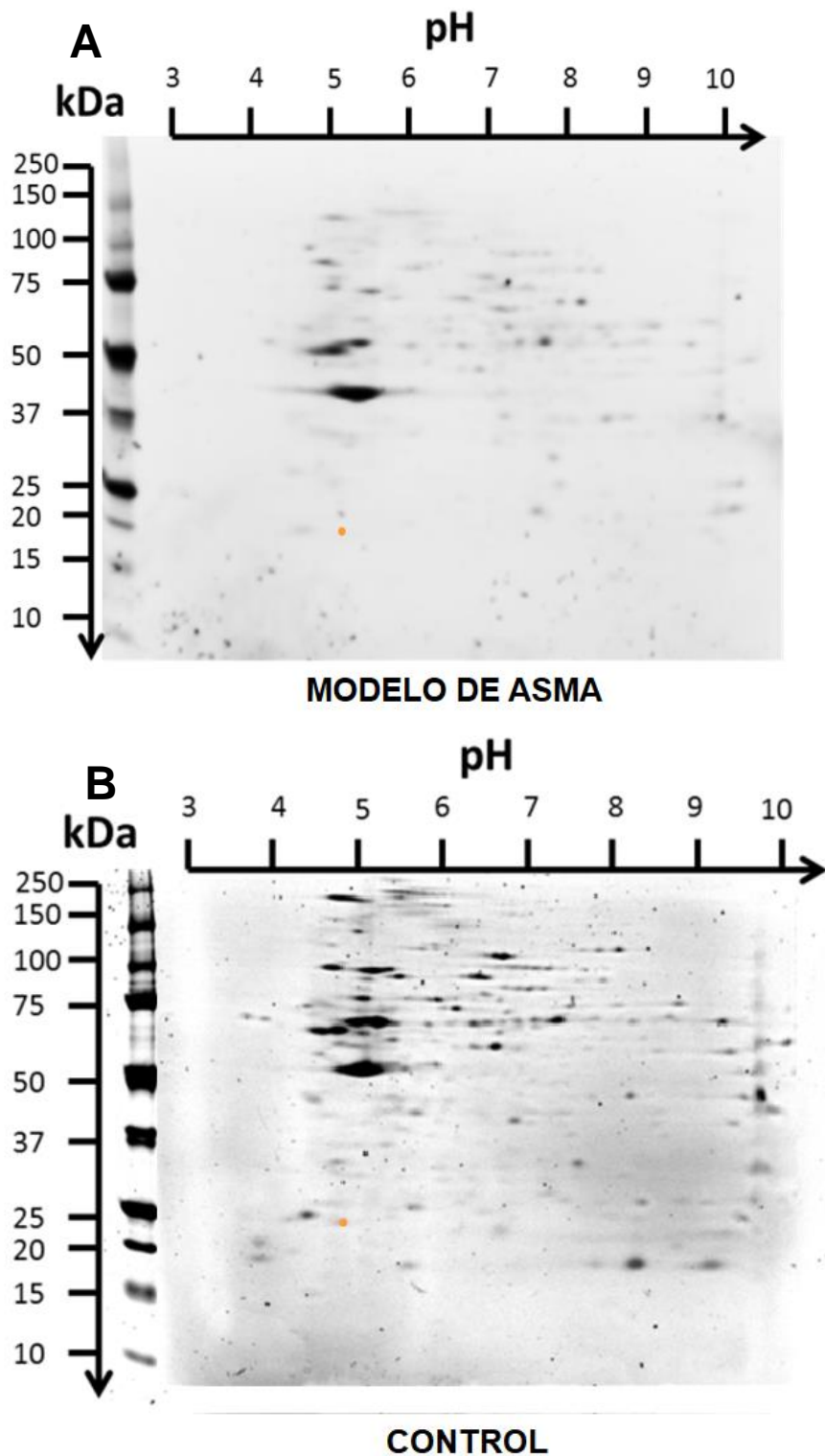


Figura 25. Mapa proteómico de micocitos traqueales de cobayo. A) Expresión de proteínas que aumentan su expresión en animales de modelo de asma comparado con el control (1 punto color naranja). B) Expresión de proteínas que disminuyen su expresión en animales del grupo control comparado con el grupo control (1 punto color naranja). Electroforesis de doble dimensión (2D), cada gel cargado con 200 μ g de proteína total cuantificada previamente. Tinción con SYPRO Ruby.

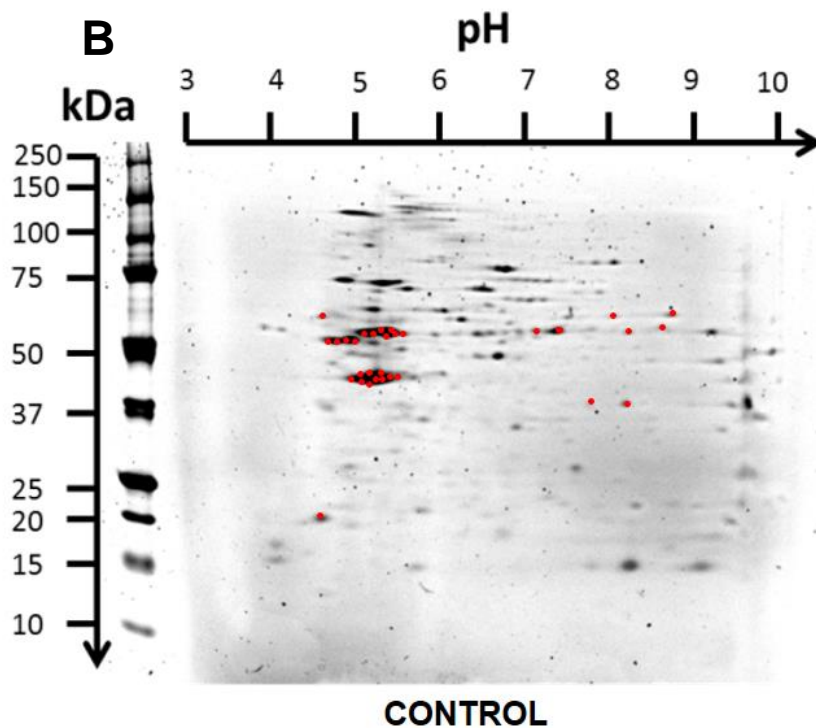
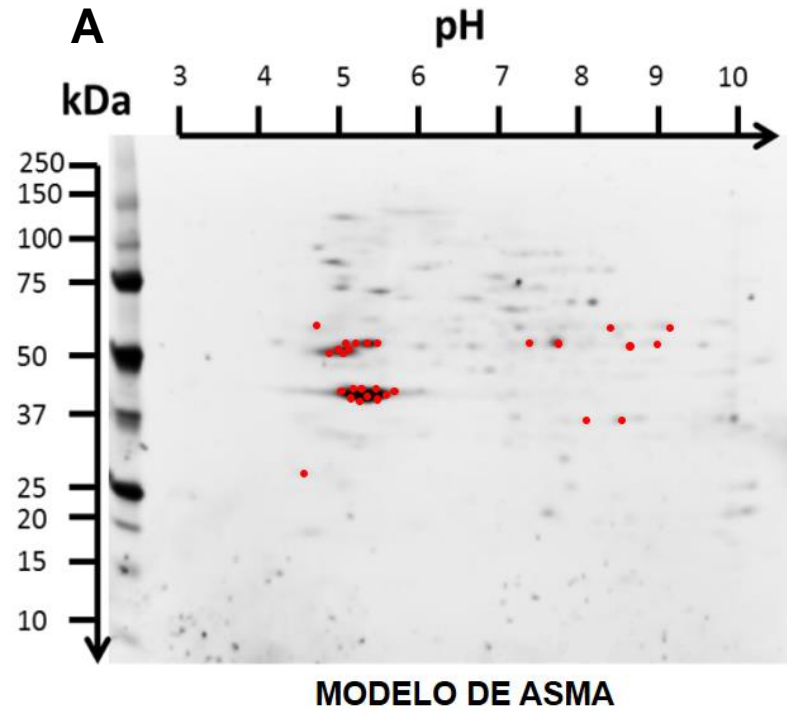


Figura 26. Mapa proteómico de micocitos traqueales de cobayo. A) Expresión de proteínas presentes en ambos grupos que no aumentan ni disminuyen su expresión (modelo de asma, 28 puntos color rojo). B) Expresión de proteínas presentes en ambos grupos que no aumentan ni disminuyen su expresión (controles, 31 puntos color rojo). Electroforesis de doble dimensión (2D), cada gel cargado con 200 μ g de proteína total cuantificada previamente. Tinción con SYPRO Ruby.

5. Expresión de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma mediante inmunoelectroforesis.

A través de la técnica de inmunoelectroforesis y con el uso de un anticuerpo específico se evaluó la expresión de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos. En la Figura 27A podemos observar que la inmunoelectroforesis de una dimensión (1D) mostró la presencia de tres isoformas de MYPT1 correspondientes a las bandas de 130, 120 y 75 kDa en los miocitos traqueales de cobayos controles. Por otro lado, en los miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma se observó la presencia de seis isoformas correspondientes a las bandas de 150, 135, 100, 75, 50 y 40 kDa (Figura 27A y 27C). Además, el análisis de densitometría mostró que la banda de 130 kDa disminuye en el grupo de modelo de asma en comparación con el grupo control, aunque dicha disminución no es significativa. Por otro lado, la banda de 75 kDa tiene un incremento estadísticamente significativo en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles ($*P<0.05$, $n=3$), (Figura 27C).

Para finalizar con el análisis de la inmunoelectroforesis 1D, se agruparon los valores de densitometría para todas las bandas correspondientes a cada grupo y así determinar la expresión total de MYPT1 (Figura 27B). El análisis mostró que de acuerdo a la expresión total de MYPT1, es decir, tomando en cuenta todas las bandas o isoformas obtenidas, MYPT1 tuvo un incremento estadísticamente significativo en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles, ($*P<0.0001$, $n=3$), (Figura 27B).

El análisis de la inmunoelectroforesis de doble dimensión (2D), confirma la presencia de proteínas con pesos moleculares encontrados en la Figura 27A. Además, logramos observar que para cada banda identificada en la inmunoelectroforesis 1D, corresponde en algunos casos, la presencia de más de una isoforma de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos controles (Figura 27D) y del modelo de asma (Figura 27E).

MYPT1

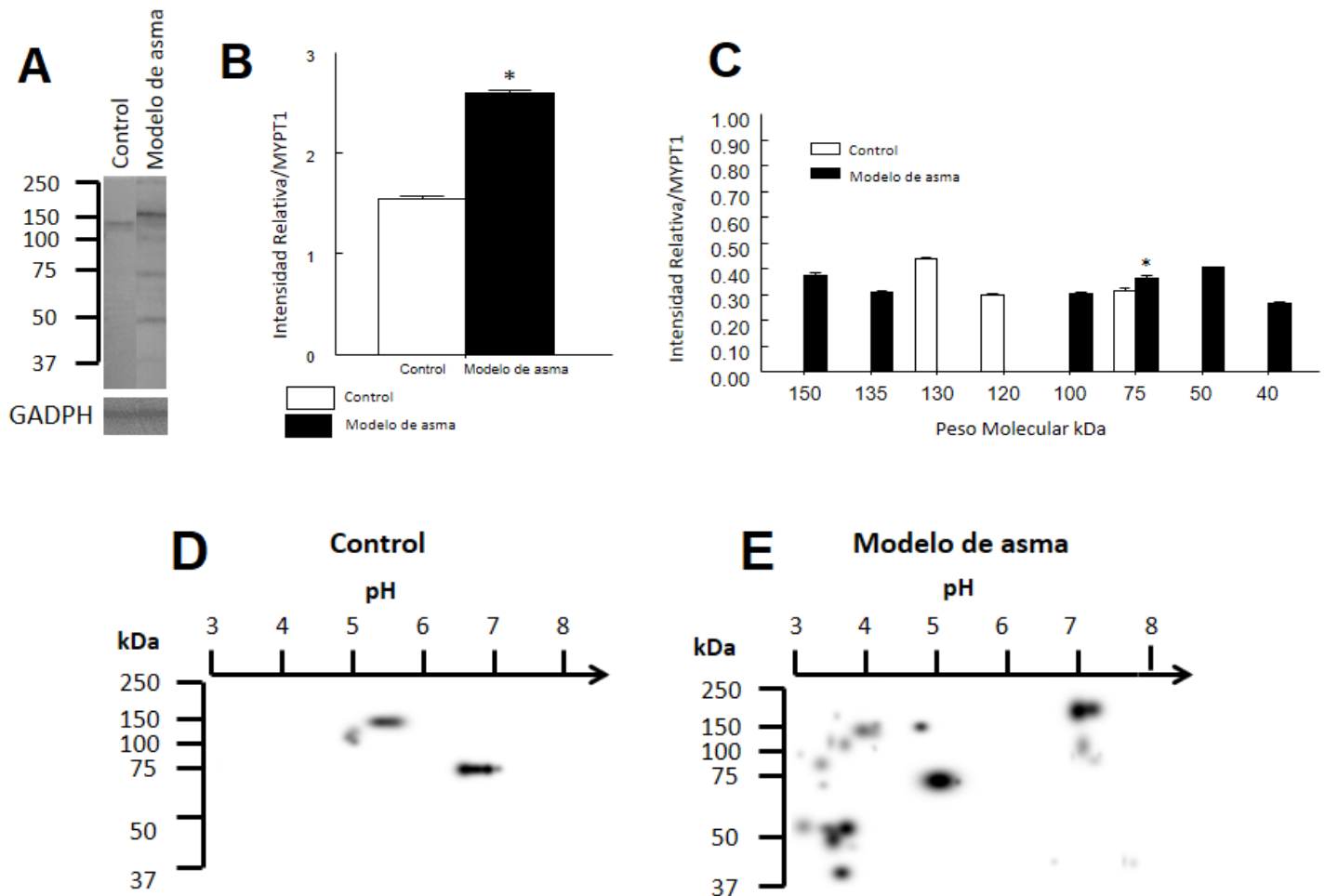


Figura 27. Expresión de MYPT1 en modelo de asma. A) Isoformas MYPT1 total del grupo control y grupo del modelo de asma con diversos pesos moleculares. B) Densitometría promedio de las isoformas de MYPT1 en cobayos del modelo de asma (barra negra) en comparación con cobayos controles (barra blanca); $*P < 0.001$, $n=3$ *t* Student no pareada. C) Densitometría de isoformas de MYPT1 de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, $*P < 0.05$, $n=3$ *t* Student no pareada. D-E) Inmunolectroforesis de MYPT1 de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, respectivamente. Los puntos negros muestran la marca positiva para MYPT1.

6. Expresión de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma mediante inmunoelectroforesis.

Por medio de inmunoelectroforesis y el uso de un anticuerpo específico, se evaluó la expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo de serina 507 (MYPT1-Ser⁵⁰⁷) en miocitos traqueales de cobayos. En el análisis de inmunoelectroforesis de una dimensión observado en la Figura 28A, se muestra la presencia de tres isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ correspondientes a las bandas 130, 75 y 50 kDa en miocitos traqueales de cobayos controles. Por otro lado, en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma, se observó la presencia de seis isoformas correspondientes a las bandas de 150, 135, 100, 75, 50 y 40 kDa (Figura 28A y 28C). Además, el análisis de densitometría mostró dos bandas, una de 75 y otra de 50 kDa que tienen un incremento estadísticamente significativo en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (75 kDa * $P < 0.05$, 50 ** $P < 0.01$, $n=3$), (Figura 28C).

Para finalizar con el análisis de la inmunoelectroforesis 1D, agrupamos los valores de densitometría para todas las bandas correspondientes a cada grupo y así determinar la expresión de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ (Figura 28B).

El análisis mostró que de acuerdo a la expresión de MYPT1-Ser⁵⁰⁷, ésta tuvo un incremento estadísticamente significativo en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.0001$, $n=3$), (Figura 28B). El análisis de la inmunoelectroforesis de doble dimensión, confirma la presencia de proteínas con pesos moleculares encontrados en la Figura 28A. Además, logramos observar que para cada banda identificada en la inmunoelectroforesis 1D, corresponde en algunos casos, a la presencia de más de una isoforma de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en miocitos traqueales de cobayos controles (Figura 28D) y del modelo de asma (Figura 28E).

MYPT1-Ser⁵⁰⁷

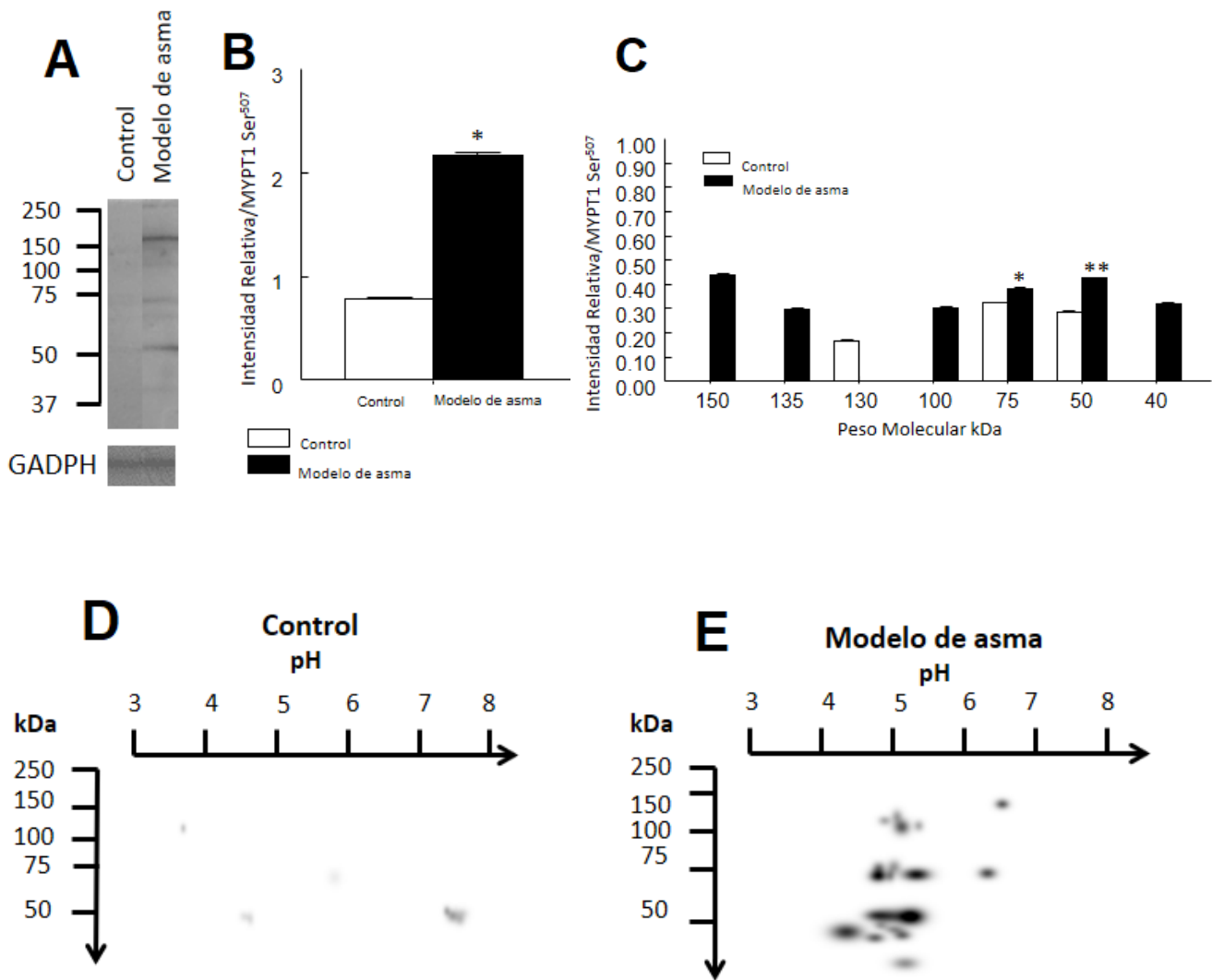


Figura 28. Expresión de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en cobayos. A) Isoformas MYPT1-Ser⁵⁰⁷ del grupo control y del grupo del modelo de asma con diversos pesos moleculares. B) Densitometría promedio de las isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en cobayos del modelo de asma (barra negra) en comparación con cobayos controles (barra blanca); * $P < 0.001$, $n = 3$ *t* Student no pareada. C) Densitometría de isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ *t* Student no pareada. D-E) Inmuno-electroforesis de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, respectivamente. Los puntos negros muestran la marca positiva para MYPT1-Ser⁵⁰⁷.

7. Expresión de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma mediante inmunolectroforesis.

Mediante inmunolectroforesis y el uso de un anticuerpo específico, se evaluó la expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo de serina 668 (MYPT1-Ser⁶⁶⁸) en miocitos traqueales de cobayos. En el análisis de inmunolectroforesis de una dimensión que se observa en la Figura 29A, se muestra la presencia de tres isoformas de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ correspondientes a las bandas 130, 75 y 45 kDa en miocitos traqueales de cobayos controles. Por otro lado, en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma, se observa la presencia de seis isoformas correspondientes a las bandas de 150, 135, 100, 75, 50 y 40 kDa (Figura 29A y 29C). Además, el análisis de densitometría mostró que la banda de 75 tiene un incremento estadísticamente significativo en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.05$, $n=3$), (Figura 29C).

Para finalizar con el análisis de la inmunolectroforesis 1D, también se agruparon los valores de densitometría para todas las bandas correspondientes a cada grupo y así poder determinar la expresión de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ (Figura 29B). El análisis mostró que de acuerdo a la expresión de MYPT1-Ser⁶⁶⁸, ésta tuvo un incremento estadísticamente significativo en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.0001$, $n=3$), (Figura 29B).

El análisis de la inmunolectroforesis de doble dimensión (2D), confirma la presencia de proteínas con pesos moleculares encontrados en la Figura 29A. Además, se logró observar que para cada banda identificada en la inmunolectroforesis 1D, corresponde en algunos casos, la presencia de más de una isoforma de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en miocitos traqueales de cobayos controles (Figura 29D) y cobayos del modelo de asma (Figura 29E).

MYPT1-Ser⁶⁶⁸

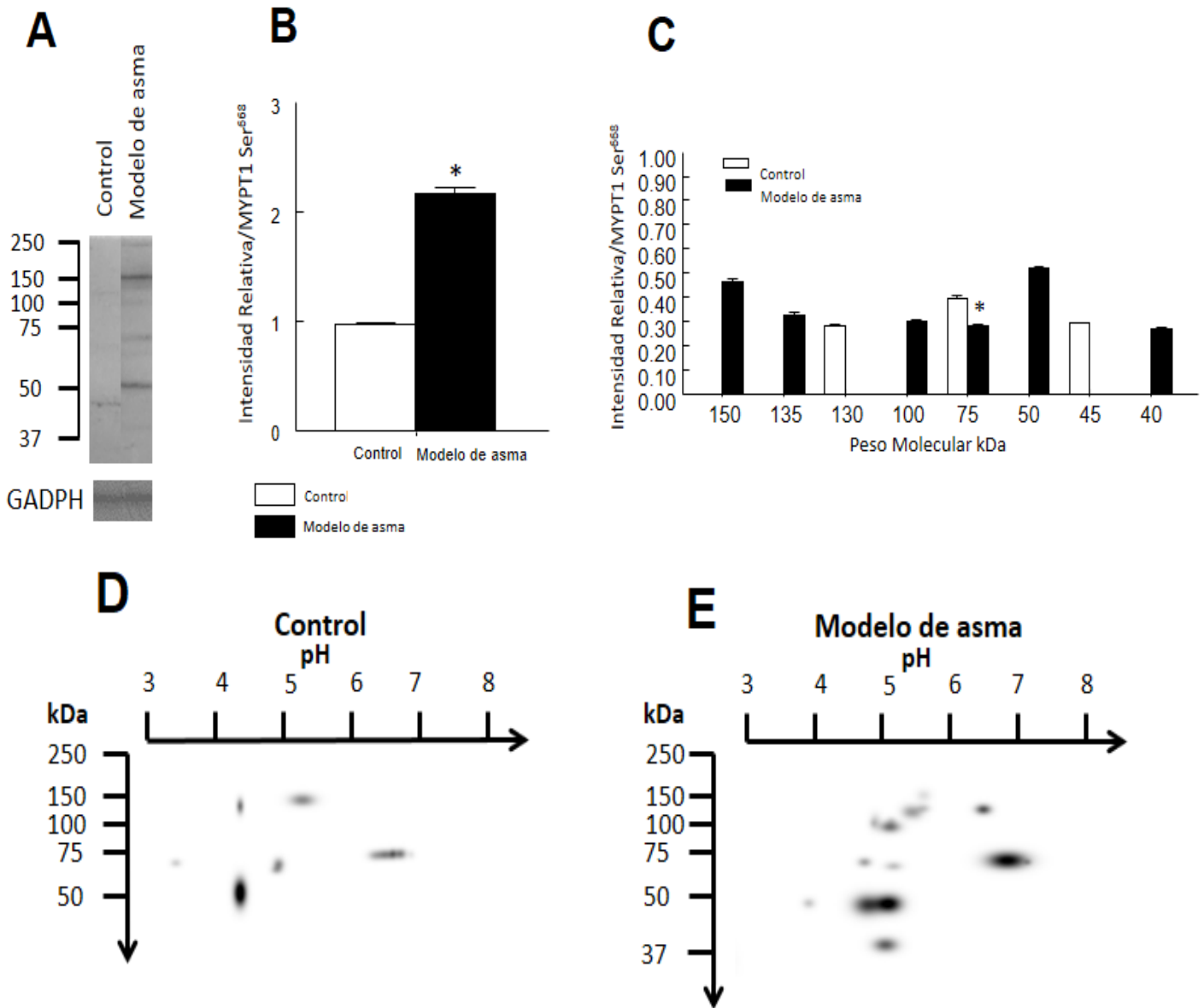


Figura 29. Expresión de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en modelo de asma. A) Isoformas MYPT1-Ser⁶⁶⁸ del grupo control y grupo del modelo de asma con diversos pesos moleculares. B) Densitometría promedio de las isoformas de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en cobayos del modelo de asma (barra negra) en comparación con cobayos controles (barra blanca); * $P < 0.001$, $n = 3$ *t* Student no pareada. C) Densitometría de isoformas de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, * $P < 0.05$, $n = 3$ *t* Student no pareada. D-E) Inmunolectroforesis de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ de cobayos controles y de cobayos del modelo de asma, respectivamente. Los puntos negros muestran la marca positiva para MYPT1-Ser⁶⁶⁸.

8. Expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma mediante inmunolectroforesis.

Por medio de inmunolectroforesis y el uso de un anticuerpo específico, se evaluó la expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo de treonina 696 (MYPT1-Thr⁶⁹⁶) en miocitos traqueales de cobayos. En el análisis de inmunolectroforesis de una dimensión que se observa en la Figura 30A, se muestra la presencia de dos isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ correspondientes a las bandas 130 y 75 kDa en miocitos traqueales de cobayos controles. Por otro lado, en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma, se observa la presencia de seis isoformas correspondientes a las bandas de 150, 135, 100, 75, 50 y 40 kDa (Figura 30A y 30C). Además, el análisis de densitometría mostró que en el caso de MYPT1-Thr⁶⁹⁶, no existe un incremento estadísticamente significativo en ninguna de las isoformas observadas (Figura 30C). Para finalizar con el análisis de la inmunolectroforesis 1D, agrupamos los valores de densitometría para todas las bandas correspondientes a cada grupo y así poder determinar la expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ (Figura 30B).

El análisis mostró que de acuerdo a la expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶, ésta tuvo un incremento estadísticamente significativo en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.0001$, $n=3$), (Figura 30B).

El análisis de la inmunolectroforesis de doble dimensión, confirma la presencia de proteínas con pesos moleculares encontrados en la Figura 30A. Además, logramos observar que para cada banda identificada en la inmunolectroforesis 1D, corresponde en algunos casos, la presencia de más de una isoforma de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en miocitos traqueales de cobayos controles (Figura 30D) y del modelo de asma (Figura 30E).

MYPT1-Thr⁶⁹⁶

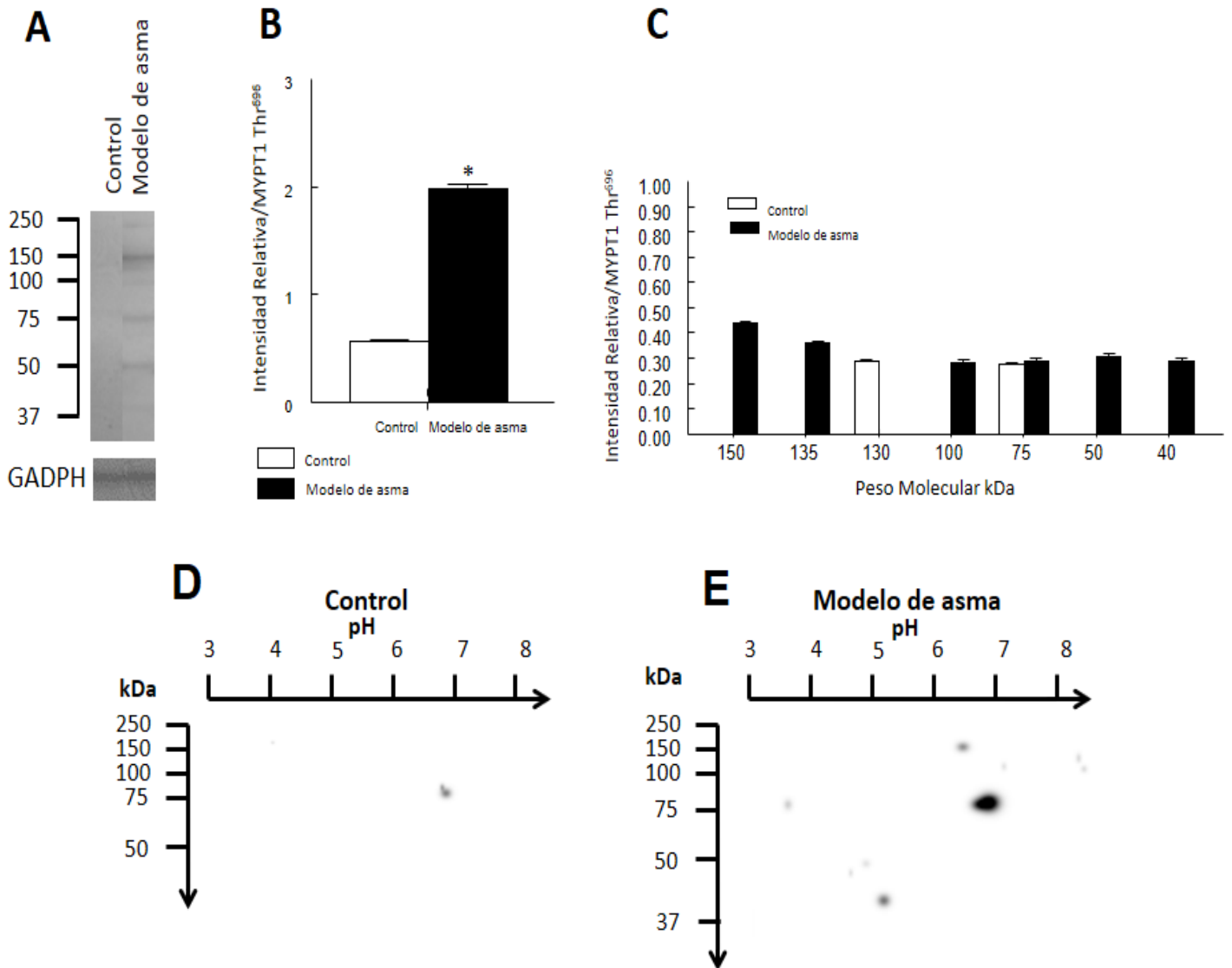


Figura 30. Expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en modelo de asma. A) Isoformas MYPT1-Thr⁶⁹⁶ del grupo control y grupo del modelo de asma con diversos pesos moleculares. B) Densitometría promedio de las isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en cobayos del modelo de asma (barra negra) en comparación con cobayos controles (barra blanca); * $P < 0.001$, $n = 3$ *t* Student no pareada. C) Densitometría de isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, * $P < 0.05$, $n = 3$ *t* Student no pareada. D-E) Inmunolectroforesis de MYPT1-Ser⁶⁹⁶ de cobayos controles y de cobayos del modelo de asma, respectivamente. Los puntos negros muestran la marca positiva para MYPT1-Ser⁶⁹⁶.

9. Expresión de MYPT1-Thr⁸⁵³ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma mediante inmunolectroforesis

Mediante inmunolectroforesis y el uso de un anticuerpo específico, se evaluó la expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo de treonina 853 (MYPT1-Thr⁸⁵³) en miocitos traqueales de cobayos. En el análisis de inmunolectroforesis de una dimensión que se observa en la Figura 31A, se muestra la presencia de tres isoformas de MYPT1-Thr⁸⁵³ correspondientes a las bandas 130, 75 y 45 kDa en miocitos traqueales de cobayos controles. Por otro lado, en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma, se observa la presencia de siete isoformas correspondientes a las bandas de 150, 100, 75, 50, 48, 40 y 37 kDa (Figura 31A y 31C). Además, el análisis de densitometría mostró que una banda de 75 kDa tiene un incremento estadísticamente significativo en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.05$, $n=3$), (Figura 31C).

Para finalizar con el análisis de la inmunolectroforesis 1D, agrupamos los valores de densitometría para todas las bandas correspondientes a cada grupo y así poder determinar la expresión de MYPT1-Thr⁸⁵³ (Figura 31B). El análisis mostró que de acuerdo a la expresión de MYPT1-Thr⁸⁵³, ésta tuvo un incremento estadísticamente significativo en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles (* $P < 0.0001$, $n=3$), (Figura 31B).

El análisis de la inmunolectroforesis de doble dimensión, confirma la presencia de proteínas con pesos moleculares encontrados en la Figura 31A. Además, logramos observar que para cada banda identificada en la inmunolectroforesis 1D, corresponde en algunos casos, a la presencia de más de una isoforma de MYPT1-Thr⁸⁵³ en miocitos traqueales de cobayos controles (Figura 31D) y del modelo de asma (Figura 31E).

MYPT1-Thr⁸⁵³

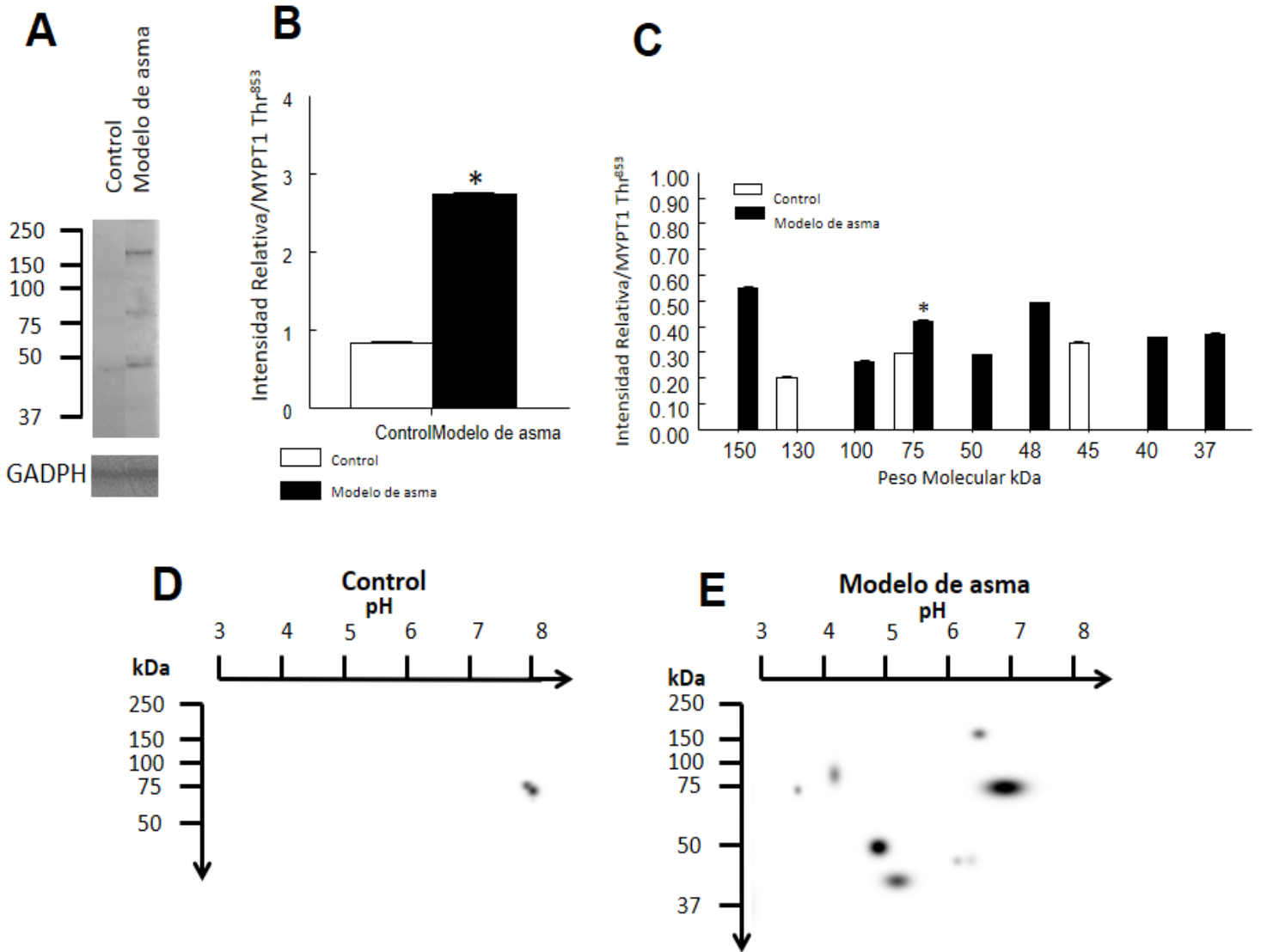


Figura 31. Expresión de MYPT1-Thr⁸⁵³ en modelo de asma. A) Isoformas MYPT1-Thr⁸⁵³ del grupo control y grupo del modelo de asma con diversos pesos moleculares. B) Densitometría promedio de las isoformas de MYPT1-Thr⁸⁵³ en cobayos del modelo de asma (barra negra) en comparación con cobayos controles (barra blanca); * $P < 0.001$, $n = 3$ *t* Student no pareada. C) Densitometría de isoformas de MYPT1-Thr⁸⁵³ de cobayos controles y cobayos del modelo de asma, * $P < 0.05$, $n = 3$ *t* Student no pareada. D-E) Inmunolectroforesis de MYPT1-Thr⁸⁵³ de cobayos controles y de cobayos del modelo de asma, respectivamente. Los puntos negros muestran la marca positiva para MYPT1-Thr⁸⁵³.

10. Análisis de modificaciones post-traduccionales de MYPT1 *in silico*.

Para determinar si la MYPT1 es susceptible a sufrir modificaciones post-traduccionales, se desarrolló un análisis *in silico* a través de la organización de la secuencia de MYPT1 de cobayo en distintas bases de datos que se encuentran disponibles en la red.

Acetilación	No
Glicosilación	Si (31)
N-Glicosilación	Si (11)
O-Glicosilación	Si (>30)
Fosforilación	Si Ser (82)
Fosforilación	Si Thr (23)
Fosforilación	Si Tyr (8)
Miristoilación	No
SUMOilación	Si (5)

Cuadro 3. Análisis de posibles modificaciones post-traduccionales en MYPT1 de cobayo.

El análisis muestra que la secuencia de MYPT1 de cobayo es susceptible a tener diversas modificaciones post-traduccionales. En el caso de glicosilación, la secuencia de MYPT1 tiene 31 sitios potenciales para tener este tipo de modificación. Sin embargo, haciendo el análisis de forma independiente, se encontró que la secuencia tiene 11 sitios potenciales para ser modificados por N-Glicosilación y hasta 30 sitios potenciales para O-Glicosilación. Por otro lado, se encontró que la secuencia de MYPT1 tiene 82 sitios potenciales para ser fosforilada en serinas, 23 sitios en treoninas y 8 sitios en tirosinas. Finalmente, la secuencia de MYPT1 tiene 5 sitios potenciales para la modificación por SUMOilación. En el caso de modificaciones post-traduccionales como acetilación y miristoilación, no se encontraron sitios potenciales en la secuencia de MYPT1 de cobayo.

11. Localización subcelular de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma.

A través de la técnica de fraccionamiento subcelular, se logró identificar la localización de MYPT1 en los miocitos traqueales, tanto en cobayos controles como en cobayos del modelo de asma. Las flechas negras representan aquellas isoformas de MYPT1 que se expresan en todas las fracciones subcelulares analizadas, excepto en la cromatina de núcleo y en citoesqueleto. En estos dos fraccionamientos celulares no se encontró ningún tipo de isoforma de MYPT1. Las isoformas señaladas en flechas negras, pesan 50 kDa y un poco más de 37 kDa. Sin embargo, las isoformas que caen entre los dos pesos moleculares antes mencionados sólo se expresan en citoplasma y membrana. Las flechas amarillas que se encuentran entre 50 y 37 kDa, señalan que en el fraccionamiento subcelular correspondiente a núcleo no se localizó MYPT1. Por otro lado, en los fraccionamientos subcelulares de membrana y núcleo indicados con flechas azules y con pesos moleculares de 150 y 130 kDa respectivamente, MYPT1 se expresa en cobayos controles y en cobayos del modelo de asma. Por último, las flechas rojas nos indican dos isoformas de MYPT1, una de 130 kDa en citoplasma y la otra de 75 kDa en núcleo que se expresan sólo en el grupo de cobayos del modelo de asma (Figura 32).

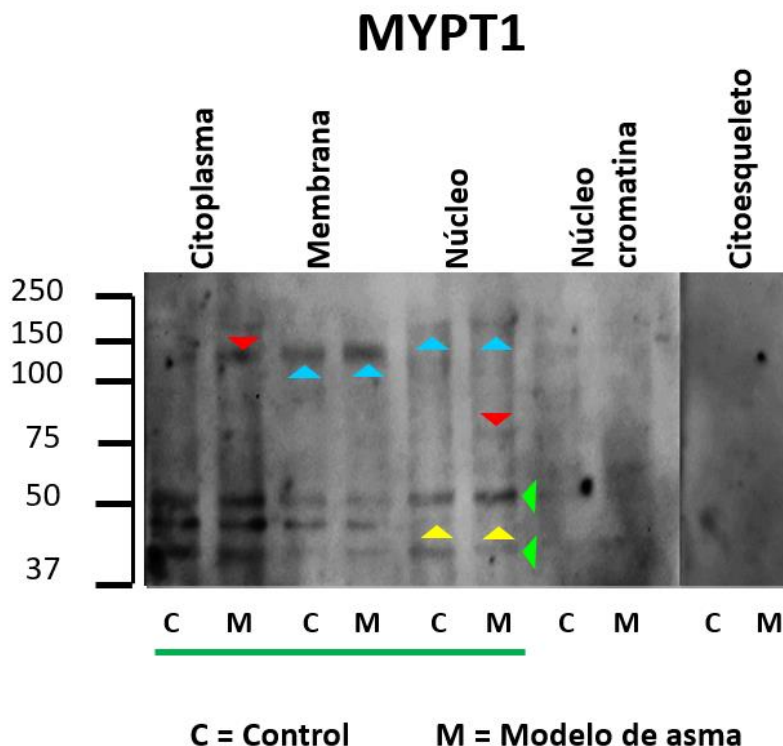


Figura 32. Localización subcelular de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayo. Se determinó mediante fraccionamiento subcelular y posteriormente con una identificación a través de un anticuerpo específico, que hay isoformas de MYPT1 que se expresan de forma diferencial en distintos compartimentos subcelulares en miocitos traqueales de cobayos. La línea verde indica los compartimentos celulares en los que se encontraron isoformas de MYPT1

12. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma.

Por medio de la técnica de fraccionamiento subcelular, se logró identificar la localización de MYPT1 fosforilada en el residuo serina 507 (MYPT1-Ser⁵⁰⁷) en los miocitos traqueales, tanto en cobayos controles como en cobayos del modelo de asma. Las flechas verdes representan aquellas isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ correspondientes a 150, 75, 50 y 37 kDa que son expresadas en los compartimentos subcelulares de citoplasma, membrana, núcleo y núcleo asociado a la cromatina en ambos grupos. De igual forma, dos isoformas marcadas también en color verde que se encuentran entre 75 y 50 kDa y entre 50 y 37 kDa respectivamente, son expresadas en citoplasma, membrana, núcleo y núcleo asociado a la cromatina. Las flechas en color amarillo correspondiente a una isoforma que se localiza por debajo de 37 kDa, señalan que en el fraccionamiento subcelular correspondiente a membrana no se encuentra MYPT1-Ser⁵⁰⁷, pero sí es localizada en citoplasma, núcleo y núcleo asociado a la cromatina. Por otro lado, las flechas azules indican que la isoforma de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ correspondiente a 100 kDa se localiza en el citoplasma y en núcleo, expresada tanto en los cobayos controles como en los cobayos del modelo de asma. Para una isoforma identificada entre 50 y 37 kDa, marcada con la flecha blanca, se observa su expresión en citoplasma, membrana y núcleo. Por último, la flecha roja que corresponde a una isoforma por debajo de 37 kDa, se expresa sólo en el grupo del modelo de asma en el compartimento subcelular de membrana (Figura 33).

MYPT1-Ser⁵⁰⁷

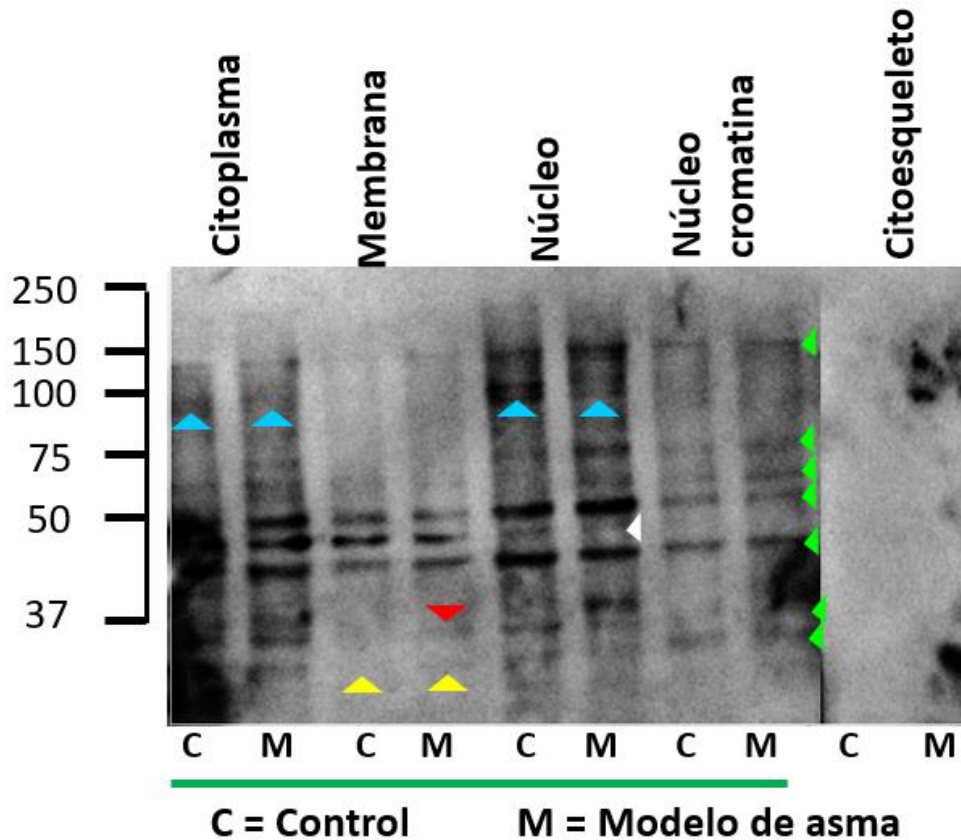


Figura 33. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ en miocitos traqueales. Se determinó mediante fraccionamiento subcelular y posteriormente con una identificación a través de un anticuerpo específico, que hay isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷ que se expresan de forma diferencial en distintos compartimentos subcelulares en miocitos traqueales de cobayo. La línea verde indica los compartimentos celulares en los que se encontraron isoformas de MYPT1-Ser⁵⁰⁷.

13. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma

Mediante la técnica de fraccionamiento subcelular, se identificó la localización de MYPT1 fosforilada en el residuo serina 668 (MYPT1-Ser⁶⁶⁸) en los miocitos traqueales, tanto en cobayos controles como en cobayos del modelo de asma. Una isoforma de aproximadamente 37 kDa marcada con una flecha verde, fue localizada en los compartimentos subcelulares de citoplasma, membrana, núcleo y núcleo asociado a la cromatina, mientras que una segunda flecha verde indica una isoforma que recae entre 50 y 37 kDa que se expresa en citoplasma, núcleo y núcleo asociado a la

cromatina, pero no en membrana, tal como lo marcan las flechas amarillas. De igual forma, las flechas amarillas que localizan una isoforma por debajo de 37 kDa indican que no es expresada en membrana. Sin embargo, la flecha blanca señala que dicha isoforma identificada por debajo de 37 kDa, es expresada en citoplasma y núcleo. Por otro lado, las flechas azules muestran que la isoforma de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ correspondiente a 100 kDa sólo se expresa en núcleo de cobayos controles y en cobayos del modelo de asma, al igual que la isoforma de 50 kDa, también marcada con flechas azules, identificada en el citoplasma. Finalmente, la flecha roja indica que una isoforma de 50 kDa fue encontrada solo en el citoesqueleto de cobayos del modelo de asma (Figura 34).

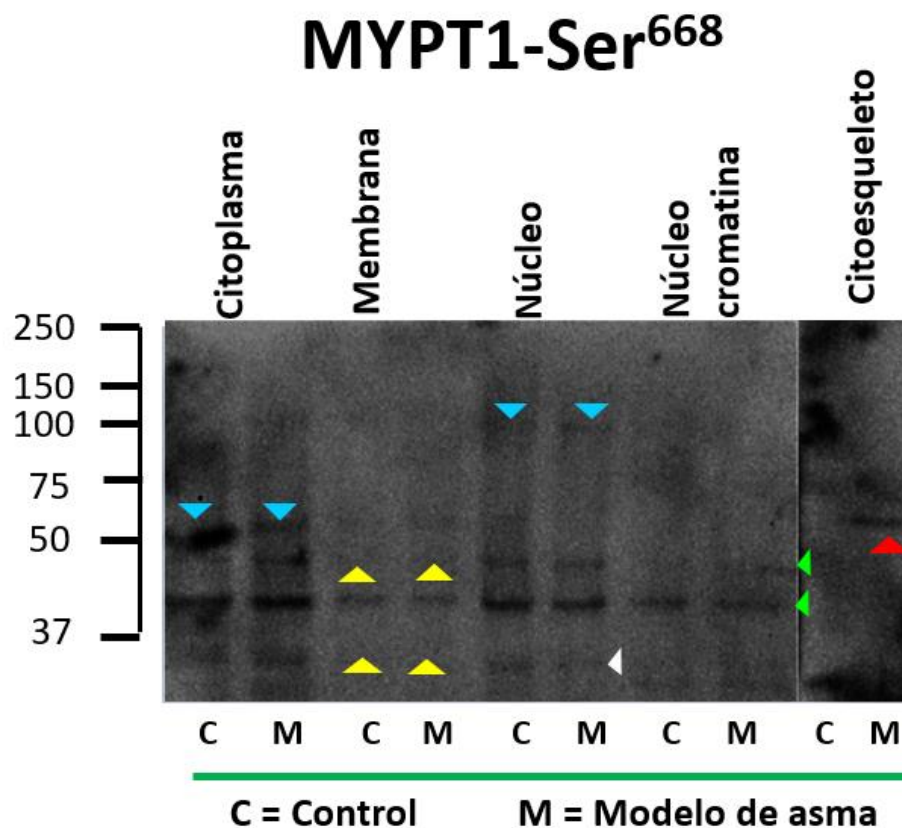


Figura 34. Localización subcelular de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en miocitos traqueales. Se determinó mediante fraccionamiento subcelular y posteriormente con una identificación a través de un anticuerpo específico, que hay isoformas de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ que se expresan de forma diferencial en distintos compartimentos subcelulares en miocitos traqueales de cobayo. La línea verde indica los compartimentos celulares en los que se encontraron isoformas de MYPT1-Ser⁶⁶⁸.

14. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma

A través de la técnica de fraccionamiento subcelular, se logró identificar la localización de MYPT1 fosforilada en el residuo treonina 696 (MYPT1-Thr⁶⁹⁶) en los miocitos traqueales, tanto en cobayos controles como en cobayos del modelo de asma. Las flechas verdes representan aquellas isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ que se expresan en todas las fracciones subcelulares analizadas, excepto en el citoesqueleto, en donde no se encontró ningún tipo de isoforma de MYPT1-Thr⁶⁹⁶. Dichas isoformas corresponden a una banda localizada entre 75 y 50 kDa, una más señalada entre 50 y 37 kDa y dos isoformas de aproximadamente 200 y 50 kDa. Cabe mencionar que la isoforma de 50 kDa presenta un aumento claro de su expresión en el citoplasma y en membrana. Por otro lado, la flecha blanca indica una isoforma ubicada entre 100 y 75 kDa, la cual solo es expresada en núcleo y núcleo asociado a la cromatina para ambos grupos. Las flechas azules señalan una isoforma de aproximadamente 37 kDa localizada en núcleo y tres isoformas más de 100, 75 y una ubicada por debajo de 37 kDa presentes en núcleo asociado a la cromatina. Por último, las flechas rojas muestran isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ observadas solo en cobayos del modelo de asma. Dichas isoformas corresponden a una banda de entre 100 y 75 kDa en citoplasma, dos bandas de 75 kDa localizadas en membrana y núcleo, y dos bandas de 37 kDa ubicadas en citoplasma y núcleo asociado a la cromatina (Figura 35).

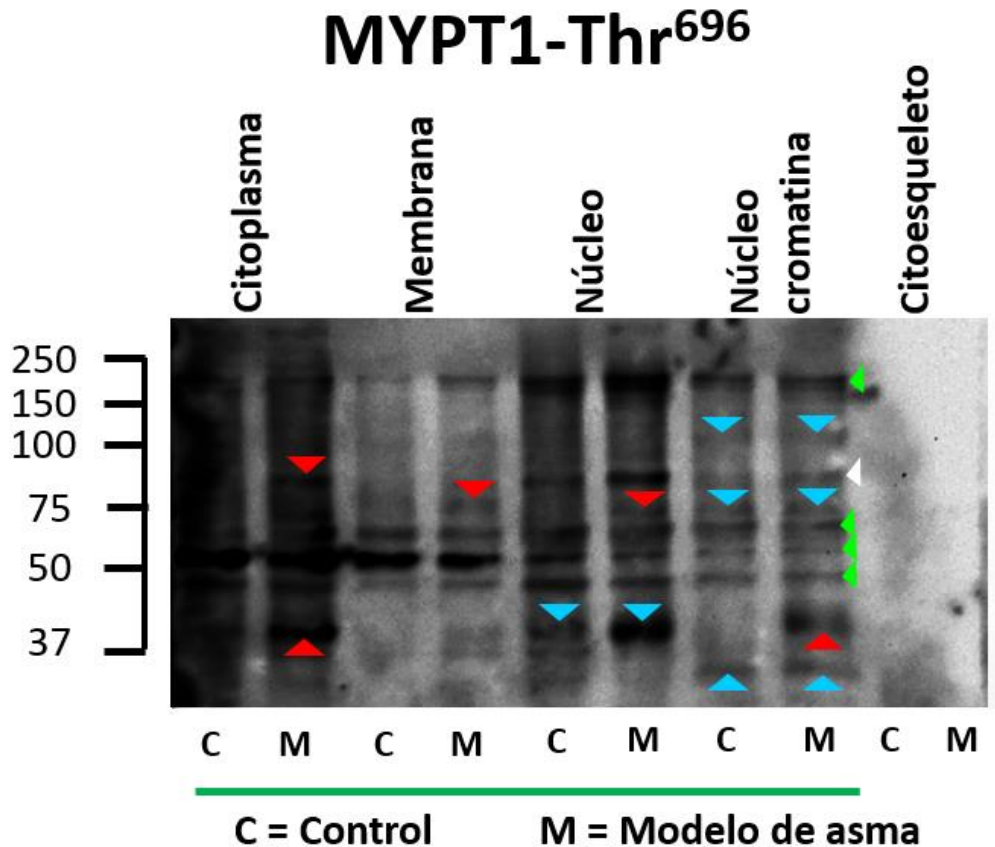


Figura 35. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en miocitos traqueales. Se determinó mediante fraccionamiento subcelular y posteriormente con una identificación a través de un anticuerpo específico, que hay isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ que se expresan de forma diferencial en distintos compartimentos subcelulares en miocitos traqueales de cobayo. La línea verde indica los compartimentos celulares en los que se encontraron isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶.

15. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁸⁵³ en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma

Por medio de la técnica de fraccionamiento subcelular, se identificó la localización de MYPT1 fosforilada en el residuo treonina 696 (MYPT1-Thr⁸⁵³) en los miocitos traqueales, tanto en cobayos controles como en cobayos del modelo de asma. Las flechas verdes representan aquellas isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ que se expresan en todas las fracciones subcelulares analizadas, excepto en el citoesqueleto, en donde no se encontró ningún tipo de isoforma de MYPT1-Thr⁶⁹⁶. Dichas isoformas corresponden a una banda localizada entre 75 y 50 kDa, una más señalada entre 50 y 37 kDa y dos isoformas de 150 y 50 kDa. Cabe mencionar que la isoforma de 50 kDa

presenta un incremento de su expresión en el citoplasma y en membrana, mientras que la isoforma de 150 kDa presenta un aumento de expresión en el núcleo. Por otro lado, la flecha blanca indica una isoforma de 75 kDa, la cual solo es expresada en núcleo y núcleo asociado a la cromatina para ambos grupos. Las flechas azules señalan una isoforma de 37 kDa localizada en núcleo y una más ubicada por debajo de 37 kDa presente en núcleo asociado a la cromatina. Por último, las flechas rojas muestran isoformas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ observadas solo en cobayos del modelo de asma. Dichas isoformas corresponden a una banda de 75 kDa en citoplasma, una banda de entre 75 y 50 kDa localizada en membrana y dos bandas de 37 kDa ubicadas en citoplasma y núcleo asociado a la cromatina respectivamente. (Figura 36).

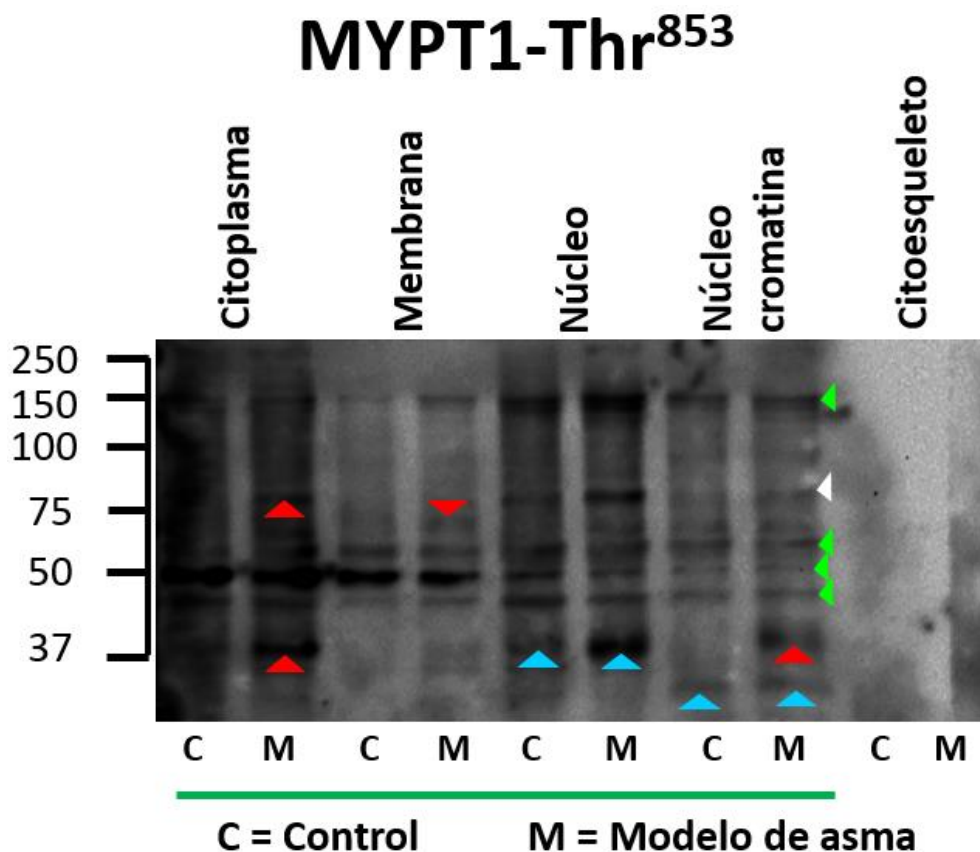


Figura 36. Localización subcelular de MYPT1-Thr⁸⁵³ en miocitos traqueales. Se determinó mediante fraccionamiento subcelular y posteriormente con una identificación a través de un anticuerpo específico, que hay isoformas de MYPT1-Thr⁸⁵³ que se expresan de forma diferencial en distintos compartimentos subcelulares en miocitos traqueales de cobayo. La línea verde indica los compartimentos celulares en los que se encontraron isoformas de MYPT1-Thr⁸⁵³.

16. Correlación entre reactividad de las vías aéreas y la expresión de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayo.

Después de la determinación de la expresión de MYPT1 y de cada una de sus formas fosforiladas, se realizó una correlación entre los valores obtenidos del análisis de la reactividad de las vías aéreas de ambos grupos, con los valores de la expresión de MYPT1, MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1⁶⁹⁶ y MYPT1⁸⁵³, también para ambos grupos (Tabla 4). En dicha tabla se presentan valores negativos que corresponden a una correlación negativa, la cual se observa para la MYPT1 y sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en la isoforma de 75 kDa (Tabla 4). De forma contraria, el valor positivo de correlación se presenta para la fosforilación de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en la isoforma de 75 kDa y para la MYPT1, MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en la isoforma de 130 kDa, lo cual indica una correlación positiva (Tabla 4).

Peso Molecular (kDa)	MYPT1	MYPT1 Ser668	MYPT1 Ser507	MYPT1 Thr696	MYPT1 Thr853
130	0.914*	0.913*	0.913*	0.912*	0.911*
75	-0.963**	0.840*	-0.989**	-0.756	-0.935**

Cuadro 4. Correlación entre los valores de reactividad en grupos de cobayos control y cobayos del modelo de asma con la expresión de MYPT1 y sus formas fosforiladas de los grupos control y grupos de modelo de asma. Los signos negativos corresponden a una correlación negativa, mientras que los signos positivos corresponden a una correlación positiva. (Correlación de *Pearson*; n=6) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Uno de los roedores mayormente utilizados para el estudio del asma ha sido el cobayo, mejor conocido como conejillo de indias (*Cavia porcellus*), debido a que presenta ciertas características que permiten el estudio de las vías aéreas, dos de las principales son la alta similitud que presentan las vías respiratorias con las del humano y que sea posible dirigir al pulmón como órgano blanco en respuesta de la hipersensibilidad de las vías aéreas para la medición directa de la hiperreactividad (Patel K. N. and Chorawala M. R. 2011). A diferencia de la rata y el ratón, el cobayo presenta infiltración de eosinófilos y neutrófilos los cuales dan paso a la inflamación similar que generalmente se presenta en el asma. Además, el cobayo cuenta con una mayor cantidad de músculo liso de las vías aéreas, lo que puede llegar a facilitar el estudio de su contracción (Patel K. N. and Chorawala M. R. 2011).

Para la observación de la respuesta fisiológica que presenta el cobayo en un modelo de asma alérgica, es necesario el uso de un alérgeno común, los más usados han sido la ovoalbúmina (OVA), o alérgenos que son directamente relevantes para el asma en el humano, tales como *Aspergillus fumigatus*, antígenos de cucarachas, extracto de ácaro de polvo doméstico (HDM) y extractos de *Ambrosia* (Chapman, D. G. *et. al*, 2014). En el presente estudio, se utilizó OVA como alérgeno para desarrollar el modelo de asma alérgica en los cobayos y se usó solución salina fisiológica (SSF) para tratar a los cobayos correspondientes al grupo control (Bazán Perkins B. *et. al*, 2009). Estudios anteriores han mostrado un aumento significativo en la broncoobstrucción basal de animales tratados con retos antigénicos de OVA, a diferencia del grupo control en donde no se presenta una modificación en la broncoobstrucción basal cuando son tratados con SSF (Álvarez Santos M., *et. al*, 2015).

En el asma, la broncoconstricción de las vías aéreas viene acompañada de hiperreactividad, la cual hace referencia a una respuesta exacerbada de la contracción del músculo liso de las vías aéreas (Grootendorst D. C. and Rabe K. F. 2004). La evaluación de la hiperreactividad dentro de este estudio, se realizó por medio de la

hipersensibilización a la histamina, en donde se evaluaron curvas de dosis respuesta a la histamina antes y después de un reto antigénico con OVA, tanto para el grupo de cobayos del modelo del asma como para los cobayos controles. Lo anterior permitió observar un aumento significativo en la reactividad de las vías aéreas en los cobayos del modelo de asma en comparación con los animales del grupo control, es decir, los cobayos con modelo de asma son hiperreactores. Varios estudios anteriores en donde se han realizado curvas de dosis respuesta a la histamina, sugieren los mismos resultados en cuanto a la presencia de una mayor reactividad de las vías aéreas de cobayos pertenecientes a un modelo de asma alérgica (Álvarez Santos M. *et. al*, 2015) (Bazán Perkins B. *et. al*, 2009). Con estos resultados podríamos sugerir que la maquinaria contráctil de los cobayos con el modelo de asma está modificada con respecto a los cobayos controles posiblemente a causa de la diferencia en la respuesta de la reactividad de las vías aéreas.

La maquinaria contráctil de las células del músculo liso de las vías aéreas está regulada por dos enzimas principales, la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que se encarga de fosforilar a la miosina para que se lleve a cabo la contracción y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) que regula la desfosforilación de la miosina para propiciar la relajación del músculo liso de las vías aéreas (Ouedraogo N. and Roux E., 2014). A su vez, la MLCP está regulada por su subunidad reguladora MYPT1. La subunidad MYPT1 puede estar regulada por varias fosforilaciones, ya sea para su activación promoviendo la actividad positiva de la MLCP y la relajación, o para su inhibición evitando la función de desfosforilación de la miosina, lo que resulta en la contracción del músculo liso de las vías aéreas (Ning Gao *et. al*, 2017), de ahí que sea de tal importancia el estudio de su expresión en el músculo liso de las vías aéreas. Por todo lo anterior, decidimos evaluar a MYPT1 en cortes histológicos de músculo liso de la traquea de cobayos del modelo de asma y cobayos controles. Dicho análisis de inmunohistoquímica mostró un aumento en la marca positiva para MYPT1 en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles. Yan Ning Qiao *et. al*, 2014, demostraron que la presencia de la MYPT1 en las arterias de ratones regula la relajación del músculo liso arterial, mientras que la eliminación total de la MYPT1 potencia la fosforilación de la cadena ligera de la miosina

y la fuerza contráctil de las arterias. Por lo anterior, se sugiere que el incremento de la marca positiva para MYPT1 en músculo liso traqueal en cobayos de modelo de asma puede ser explicado por la necesidad fisiológica de contrarrestar la hipercontracción del músculo liso de las vías aéreas que se presenta durante una crisis asmática.

La expresión de MYPT1 también se evaluó por el análisis de mRNA realizado por medio de RT-PCR. El análisis mostró que el mRNA de MYPT1 fue sobreexpresado significativamente en cobayos del modelo de asma en comparación con los controles, lo que avala el aumento presente en los cortes histológicos. Guiting Lin *et. al*, en 2010 demostraron que, en la contracción del músculo liso en tejido de uretra y vejiga de rata, se da un aumento en la expresión del mRNA de la MYPT1, lo que es necesario cuando dicho tejido debe mantener una contracción constante para que pueda expulsarse la orina. Lo anterior, puede sugerir basándonos en lo que nos dice Yan Ning Qiao *et. al*, 2014, que el aumento en la expresión del mRNA en cobayos asmáticos puede deberse a la necesidad fisiológica de contrarrestar la hipercontracción e inducir la relajación. Sin embargo, también podría sugerirse la posibilidad de que tal aumento en la expresión de mRNA de MYPT1 pueda promover la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

La funcionalidad de la MYPT1 podría depender de las fosforilaciones que ésta presente, ya que puede ser fosforilada en diferentes sitios de serinas relacionadas con la activación de la MLCP y treoninas asociadas a la inhibición de la MLCP (Xiuyue Jia *et. al*, 2016; Chen, C.-P. *et. al*, 2015). Algunos autores han referido dichas fosforilaciones a la MYPT1 humana en diferentes sitios, incluidos Ser-432, Ser-445, Ser-472, Ser-473, Ser-601, Ser-668, Ser-692, Ser-695, Ser-852, Ser-910, Thr-696 y Thr-853, fosforilados por diferentes cinasas. Generalmente se ha asociado la fosforilación de serinas a la proteína cinasa G o la proteína cinasa A, y las fosforilaciones en treoninas a la cinasa ROCK, a la proteína cinasa ZIPK y la cinasa ILK (Chen, C.-P. *et. al*, 2015). Tomando en cuenta lo anterior, se evaluó la expresión de MYPT1 y de sus principales formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ por medio de la identificación con anticuerpos específicos. En dicho análisis se encontraron diversas isoformas para todas las

variantes analizadas. Las isoformas encontradas eran similares en MYPT1 y en sus formas fosforiladas. Dichas isoformas presentaban pesos moleculares de 150, 135, 130, 100, 75, 50 y 40 kDa, a excepción de MYPT1 en donde se identificó una isoforma más de 120 kDa y en MYPT1-Thr⁸⁵³ en donde no se presentó la isoforma de 135 kDa, pero se observaron tres isoformas más de 48, 45 y 37 kDa. Seguidamente se evaluó la intensidad relativa en donde se observó un aumento significativo de la isoforma de 75 kDa en cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos controles de la MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸ y MYPT1-Thr⁸⁵³. En MYPT1-Ser⁵⁰⁷, además de la isoforma de 75 kDa, se observó un incremento de la intensidad relativa de la isoforma de 50 kDa en cobayos del modelo de asma. Algunas de las razones que podrían explicar las isoformas obtenidas en nuestro estudio se basan en las investigaciones de Hiroyuki Shimizu *et. al*, que, en el año de 1994, realizaron un estudio en el músculo liso de molleja de pollo en donde identificaron dos isoformas principales para MYPT1 de 130 y 133 kDa, sugiriendo que son resultado del empalme alternativo del gen que codifica la MYPT1. Además de lo anterior, Hiroyuki Shimizu *et. al*, realizó un experimento en el cual indujo una breve digestión de la MLCP con α -quimiotripsina, encontrando que la MYPT1 se escindió en un fragmento de 58 kDa, que al unirse con la subunidad catalítica de 37 kDa de PP1 y la subunidad pequeña de 20 kDa, se estimaba un peso molecular de la nueva holoenzima de aproximadamente 120 kDa. De igual forma, Clare M. M. Haystead *et. al*, en el año 1995 identificaron una isoforma de 110 kDa en estudios realizados con riñón de rata, además reportaron la presencia de una isoforma de 72.5 kDa resultante de un fragmento N-terminal de la isoforma de 110 kDa. Daisuke Shichi *et. al*, en el año de 2010, realizaron una serie de isoformas por medio de cortes en la secuencia proteica de la MYPT1 en células de músculo cardiaco. Curiosamente, los pesos moleculares de las isoformas elaboradas por Daisuke Shichi presentan ciertos pesos moleculares que podrían corresponder a las isoformas presentadas en nuestro estudio. Según Daisuke Shichi cuando se tiene una isoforma en la cual solo se presenta el fragmento C-terminal de MYPT1 se identifica un peso molecular de 74 kDa, cuando se presenta un fragmento de MYPT1 que contiene la región de los residuos de Thr-853 y Ser-852 pero no del zipper de leucina (LZ) se señala un peso de 50 kDa y cuando se presenta el fragmento final del dominio C-terminal de MYPT1 se observa

un peso molecular de 37 kDa. Daisuke Shichi también menciona una última isoforma de 150 kDa, de la cual no da características en cuanto a la región o asociación de MYPT1. A pesar de identificar diversas isoformas parecidas a las de nuestro estudio, Daisuke Shichi no da ninguna explicación puntual de la función de las isoformas que menciona, de ahí que sea importante en estudios futuros, aislar las isoformas y evaluar de forma independiente su posible función y relación con la actividad de la MLCP.

Las isoformas de las proteínas también podrían ser explicadas por modificaciones post-traduccionales, dentro de las cuales se encuentran la unión de pequeños ácidos grasos o carbohidratos, eliminación de residuos N-terminales, glicosilación, fosforilación, acetilación, metilación, amidación, carboxilación, nucleotidilación, miristoilación, lipidación, la ADP ribosilación, la proteólisis, adición de grupos prostéticos e incluso la unión de proteínas pequeñas como la ubiquitina o la proteína pequeña modificadora parecida a la ubiquitina (SUMO) (Zamudio-Arroyo José Manuel *et. al*, 2012).

En este estudio se realizó un análisis *in silico* donde demostramos que MYPT1 es susceptible a varias modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, N-glicosilación, O-glicosilación, fosforilaciones en residuos de Serina, Treonina y Tirosina y SUMOilación, lo cual podría explicar las diferencias de los pesos moleculares de las isoformas encontradas en nuestro estudio. Se han encontrado muchas proteínas con este tipo de modificaciones post-traduccionales que determinan una función específica, por ejemplo, la glicosilación de una proteína le puede conferir la función de protegerse a sí misma de ataques proteolíticos aumentando su vida media, aumenta también su solubilidad en un medio acuoso y es participe en el plegamiento de otras proteínas (Varki A *et. al*, 2017). Una proteína que presenta SUMOilación puede estar relacionada con la regulación transcripcional y el ciclo celular. De igual forma, si la proteína presenta una fosforilación como modificación post-traduccional, puede regular de forma directa su activación o inactivación, modificando a su vez la expresión y la capacidad de llevar a cabo su función, además podría regular su localización subcelular y la interacción con diversas proteínas (Victoria Pando Robles y César Ferreira Batista, 2014). Por todo lo anterior, las modificaciones post-traduccionales

podrían otorgar funciones diferentes para cada isoforma identificada en el presente estudio.

La función y regulación de las proteínas puede estar relacionada con la localización de las mismas dentro de la célula. Esto se ha observado para varias proteínas, incluyendo enzimas, tales como la proteína cinasa C (PKC) en estudios de músculo liso de sapos (Thomas J Eddinger, 2014) y para MYPT1 en músculo liso de aorta de cerdo, fibroblastos de ratón y riñón de humano (Masumi Eto *et. al*, 2005) (Yue Wu *et. al*, 2005). Por tanto, evaluamos la localización de MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ en el músculo liso de las vías aéreas, por medio de fraccionamiento subcelular en miocitos traqueales. Para cobayos del modelo de asma y cobayos controles encontramos que las diferentes isoformas de MYPT1 y de sus fosforilaciones en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ fueron identificadas en los compartimentos subcelulares de citoplasma, membrana plasmática, núcleo y núcleo asociado a la cromatina, a excepción MYPT1 que no se identificó en núcleo asociado a la cromatina. MYPT1-Ser⁶⁶⁸ también se localizó en el citoesqueleto de cobayos del modelo de asma, pero no de cobayos controles. Para MYPT1 identificamos dos isoformas de 130 y 75 kDa ubicadas en citoplasma y membrana plasmática de cobayos del modelo de asma, mientras que para MYPT1-Ser⁵⁰⁷ se identificó una isoforma por debajo de 37 kDa en la membrana plasmática, también en el grupo del modelo de asma. De igual forma, para MYPT1-Thr⁶⁹⁶ se presentó una isoforma mayor a 75 kDa en citoplasma, dos isoformas de 75 kDa en membrana plasmática y núcleo y dos isoformas más de 37 kDa en citoplasma y núcleo asociado a la cromatina de cobayos del modelo de asma. Finalmente, para MYPT1-Thr⁸⁵³ se observaron dos isoformas de 75 y 37 kDa en citoplasma, una isoforma de más de 50 kDa en membrana plasmática y una isoforma de 37 kDa en núcleo asociado a la cromatina en animales del modelo de asma. A pesar de que no se ha reportado información sobre la localización subcelular de las isoformas de MYPT1, Masumi Eto *et. al*, 2005, mencionan que cuando la MYPT1 de fibroblastos de rata se encuentra disociada de la PP1, se expresa localizada en núcleo, pero cuando hay una asociación de la holoenzima PP1-MYPT1, la localización de MYPT1 se identifica en el citosol depositada en los miofilamentos del citoesqueleto. Del mismo

modo, Yue Wu *et. al*, también en el año 2005, reportaron la localización de la MYPT1 en el núcleo mediante microscopía de fluorescencia en células fibroblásticas de riñón de pollo. Por otro lado, Heung-Mook Shin y colaboradores, en el año de 2002, reportaron que en células de la vena porta de hurones, la fosforilación de MYPT1 en el residuo de treonina 696, transporta a la MLCP a la membrana plasmática de las células musculares lisas en donde seguidamente se da la disociación de la holoenzima, resultando en que la fosfatasa PP1 regrese al núcleo y que MYPT1 sea localizada en la membrana plasmática. Por todo lo anterior, podría sugerirse que la regulación negativa de MYPT1 y por tanto de la fosfatasa podría estar asociada a la localización subcelular en el núcleo y membrana plasmática, siendo de vital importancia para su inhibición. Además, el hallazgo de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en el compartimento de citoesqueleto podría sugerir la importancia de la misma en la regulación de la MLCP y por tanto de la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

Para corroborar que MYPT1 está regulada de forma negativa y que podría encontrarse en núcleo, realizamos un análisis *in silico* en donde demostramos que MYPT1 presenta secuencias de acceso a núcleo, lo cual nos sugiere que MYPT1 posiblemente sí este alojada en dicho organelo. Tammy Ryan y colaboradores en el año 2013, mencionaron que las subunidades de la MLCP, refiriéndose a la PP1 y MYPT1, interactúan como cofactores transcripcionales regulando a un factor transcripcional conocido como Nkx2.5, el cual está encargado a su vez de la regulación de una serie de genes que tienen la función de moderar la biogénesis de las células musculares cardiacas. Nkx2.5 interactúa específicamente con la forma fosforilada de MLCP en el residuo de treonina 853, el cual es fosforilado por la vía de señalización de ROCK, lo que resulta en la exclusión nuclear de Nkx2.5 y una disminución en su actividad transcripcional (Ryan, T *et. al*, 2013). Tomando en cuenta lo anterior, sería de importancia evaluar en un estudio futuro si MYPT1 pudiera tener una función similar en el músculo liso de las vías aéreas.

De manera interesante, Yoshihiko Chiba y sus colaboradores en el año 2005, reportaron la implicación de la sensibilidad al calcio para la activación de la vía de señalización de RhoA/ROCK en el aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas,

en músculo liso bronquial. Del mismo modo, en dos investigaciones del año 2015, David I. Kasahara *et. al*, reportaron que la depleción de las isoformas de ROCK (ROCK1 y ROCK2) traía consigo un decremento de la hiperreactividad de las vías aéreas de ratones sensibilizados con OVA. Igualmente, un reporte de Joseph Jude y sus colaboradores en el año 2016, mencionaron que la fosforilación mediada por ROCK hacia la MYPT1 inducía un aumento en la hiperreactividad de las vías aéreas. Tomando en cuenta lo anterior y considerando que las fosforilaciones de MYPT1 podrían estar relacionadas con la regulación de la hiperreactividad, se realizó una correlación entre la expresión de dos isoformas de 130 y 75 kDa de la MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ con la hiperreactividad. Las dos isoformas fueron seleccionadas debido a que la isoforma de 130 kDa está identificada en la literatura como MYPT1, mientras que la isoforma de 75 kDa fue la que presentó un aumento significativo en MYPT1 y en la mayoría de sus formas fosforiladas. Lo que se encontró fueron valores positivos para las correlaciones de la isoforma de 130 kDa de la MYPT1 y de sus formas fosforiladas, al igual que en la correlación de la isoforma de 75 kDa de MYPT1-Ser⁶⁶⁸. Dichos valores positivos indican que, a menor hiperreactividad de la vía aérea, habrá mayor fosforilación de la proteína y viceversa, mientras que los valores negativos observados en la isoforma de 75 kDa de MYPT1, MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ nos dicen que, a mayor hiperreactividad, habrá mayor fosforilación de la proteína y viceversa. Por esto, nuestros hallazgos sugieren que el aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas puede presentarse cuando se tiene un aumento en la expresión de las formas fosforiladas en MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ para la isoforma de 74 kDa, lo cual tiene explicación según lo reportado por Chen, C. P. *et. al*, 2015, en donde menciona que las fosforilaciones para MYPT1 presentes en MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ están involucradas en la regulación negativa de la MYPT1 y por tanto en la inactivación de la MLCP y de la relajación. De igual forma, nuestros datos sugieren que la disminución de la hiperreactividad puede estar dada por un aumento en la expresión de la fosforilación en MYPT1-Ser⁶⁶⁸, lo que concuerda con lo que reportan Trent Butler y colaboradores en 2013, ya que mencionan que la fosforilación de MYPT1 en MYPT1-Ser⁶⁶⁸ induce la relajación del músculo liso, lo que se interpreta en el aumento de la función de la MLCP. Entonces la forma fosforilada de MYPT1-Ser⁶⁶⁸,

podría sugerir que cuando hay mayor hiperreactividad de las vías aéreas, se presenta un decremento de dicha fosforilación dando paso posiblemente a la inhibición de la relajación del músculo liso de las vías aéreas. Aunado a lo anterior, la localización de la fosforilación de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en el compartimento subcelular de citoesqueleto, podría sugerir que es punto clave de la regulación de la hiperreactividad y de la contracción de las vías aéreas.

CONCLUSIÓN

Nuestros datos observados reportan el aumento de la reactividad de las vías aéreas de cobayos del modelo de asma, lo que se podría interpretar como un aumento en la hiperreactividad de las vías aéreas quizás por una modificación de la maquinaria contráctil. Dicho aumento de la hiperreactividad podría estar dado por la regulación de la subunidad MYPT1 de la fosfatasa de miosina, ya que se observó un aumento en la marca de MYPT1 en cortes histológicos de tráquea y un aumento en el mRNA de MYPT1 en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma. Sin embargo, a pesar de que se identificó un aumento en la densitometría total de todas las isoformas encontradas para MYPT1, la isoforma 130 kDa reportada como MYPT1 en la literatura, presentó una disminución en el grupo del modelo de asma comparado con el control, lo que podría sugerir que MYPT1 disminuye en el asma. Así pues, la identificación de las isoformas de MYPT1 en el músculo liso de las vías aéreas podrían ser dadas por empalme alternativo, asociación de fragmentos cortos de las subunidades de MLCP o por modificaciones pos-traduccionales, sugiriendo a su vez, diferentes funciones para cada una de éstas isoformas. Además, la localización subcelular en núcleo y membrana plasmática de MYPT1 que se observó por fraccionamiento subcelular, podría estar regulando de forma negativa la función directa que tiene MYPT1 en la MLCP. Es posible que las formas fosforiladas de MYPT1 puedan estar regulando su localización, activación e inhibición, y que a su vez la expresión de dichas formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³ tengan relación con la regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas. Particularmente la forma fosforilada MYPT1-Ser⁶⁶⁸ correlacionó directamente con la hiperreactividad de las vías aéreas, sugiriendo que, a mayor hiperreactividad de las vías aéreas, se presenta un decremento de dicha fosforilación dando paso posiblemente a la inhibición de la relajación del músculo liso de las vías aéreas. Además, la localización de MYPT1-Ser⁶⁶⁸ en el compartimento subcelular de citoesqueleto, hace pensar que es punto clave de la regulación de la hiperreactividad y de la contracción de las vías aéreas.

Finalmente, en la Figura 37 mostramos un modelo molecular que sintetiza algunos de los resultados expuestos en éste estudio.

Regulación de la Hiperreactividad en miocitos traqueales

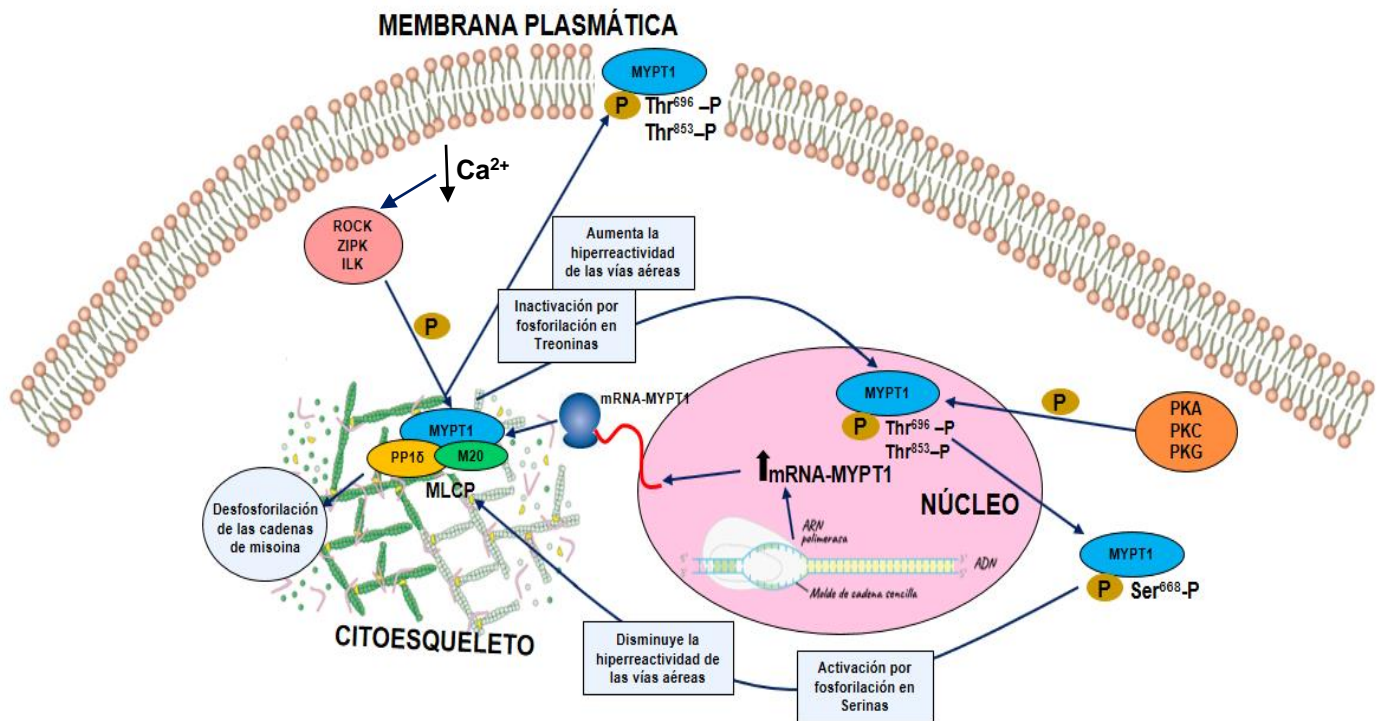


Figura 37. Regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma alérgica. En miocitos traqueales de cobayos de un modelo de asma alérgica se podría presentar un incremento en la expresión del mRNA de MYPT1 la cual estaría siendo traducida por el ribosoma en el retículo sarcoplásmico. La asociación de la MYPT1 con la subunidad catalítica PP1δ y con la subunidad pequeña M20 daría paso a la holoenzima MLCP localizada en el citosqueleto, la cual llevaría a cabo su función de desfosforilación de la cadena ligera de la miosina para inducir la relajación del músculo liso de las vías aéreas. En presencia de sensibilización al Ca^{2+} , se daría la activación de varias cinasas, principalmente de la cinasa de Rho ROCK, las cuales se encargarían de fosforilar a MYPT1 en sus residuos de treonina 696 y treonina 853, lo que provocaría una inhibición de MYPT1 y su subsecuente traslado hacia la membrana plasmática y hacia el núcleo de las células musculares lisas. Lo anterior incrementaría la hiperreactividad de las vías aéreas. La posible fosforilación de MYPT1 por varias cinasas PKs en los residuos de serina 507 y principalmente en serina 668, activaría a la MYPT1 la cual se localizaría de nuevo en el citosqueleto formando el complejo de la MLCP. Lo anterior Induciría la relajación del músculo liso de las vías aéreas y disminuiría la hiperreactividad de las vías aéreas.

PERSPECTIVAS

1. Aislar las isoformas obtenidas en el presente estudio de MYPT1 y de sus formas fosforiladas en MYPT1-Ser⁵⁰⁷, MYPT1-Ser⁶⁶⁸, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵³, para determinar su función y la relación con la MLCP.
2. Evaluar si en el músculo liso de las vías aéreas MYPT1 presenta alguna función similar a su papel nuclear en cardiomiocitos en donde interviene como cofactor transcripcional de asociación al factor transcripcional Nkx2.5.

REFERENCIAS

Alexander Khromov, Nandini Choudhury, Andra S. Stevenson, Avril V. Somlyo and Masumi Eto. (2009). Phosphorylation-dependent Autoinhibition of Myosin Light Chain Phosphatase Accounts for Ca²⁺ Sensitization Force of Smooth Muscle Contraction. *Journal of Biological Chemistry*. Aug 7; 284(32): 21569–21579.

Álvarez S. M. Dinorah. (2017). Relación de la remodelación de las vías aéreas a nivel estructural y molecular con el desarrollo de la hiperreactividad en un modelo de asma alérgica. Posgrado en ciencias biológicas. Facultad de Medicina. CDMX, México. Pp. 88

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

Amano, M., Nakayama, M., y Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinasa / ROCK: un regulador clave del citoesqueleto y la polaridad celular. *Citoesqueleto (Hoboken, Nj)*, 67 (9), 545-554. <http://doi.org/10.1002/cm.20472>

Andrew P. Somlyo and Avril V. Somlyo. (2003). Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *American Physiological Society*. <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00023.2003>

Bass Pat and Jelic Sanja. (2017). Overview of Forced Expiratory Volume (FEV1). *Clinical Pulmonary Function Testing, Exercise Testing, and Disability Evaluation*. In *Chest Medicine: Essentials Of Pulmonary And Critical Care Medicine*. <https://www.verywell.com/forced-expiratory-volume-and-asthma-200994>

Bazán Perkins B., Sánchez Guerrero E., Vargas M. H., Martínez Cordero E., Ramos Ramírez P., Álvarez Santos M. (2009). Beta 1 integrins shedding in a guinea pic model in chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy*, 39, 740-751.

Berair R., Saunders R. and Brightling C. (2013). Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. *BMC Medicine*. Pp. 1-6.

Bruce M. and Bruce A. (2009). *Berne and Levy Fisiología*. 6° edición. Ed. ELSEVIER. Barcelona, España. Pp. 799.

Chapman, D. G., Tully, J. E., Nolin, J. D., Jansen-Heininger, Y. M., & Irvin, C. G. (2014). Animal Models of Allergic Airways Disease: Where Are We and Where to Next? *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(12), 2055–2064. <http://doi.org/10.1002/jcb.24881>

Chen, C.-P., Chen, X., Qiao, Y.-N., Wang, P., He, W.-Q., Zhang, C.-H. and Zhu, M.-S. (2015). In vivo roles for myosin phosphatase targeting subunit-1 phosphorylation sites T694 and T852 in bladder smooth muscle contraction. *The Journal of Physiology*, 593(Pt 3), 681–700. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283853>

Chronic Respiratory Diseases. (2014). Consulta, septiembre 30,2017, de Public Health Agency of Canada Sitio web: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/chronic-respiratory-diseases.html>

Clare M.M. Haystead, Philippe Gailly, Andrew P. Somlyo, Avril V. Somlyo, and Timothy A.J. Haystead. (1995). Molecular cloning and functional expression of a recombinant 72.5 kDa fragment of the 110 kDa regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M. *Federation of European Biochemical Societies*. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/0014-5793%2895%2901318-0>

De Zubiría Consuegra E., De Zubiría Salgado E., De Zubiría Salgado A. (2004). *Asma Bronquial*. 2ª Ed. Bogotá, Colombia: Editorial Médica Panamericana.

Del Río Navarro B., Hidalgo Castro E., Sierra Monge J. (2009). Asma. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, (66), no.1.

Deng, M., Ding, W., Min, X., & Xia, Y. (2011). MLCK-Independent Phosphorylation of MLC20 and Its Regulation by MAP Kinase Pathway in Human Bladder Smooth Muscle Cells. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 68(3), 139–149. <http://doi.org/10.1002/cm.20471>

Eddinger, T. J. (2014). Smooth muscle – protein translocation and tissue function. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 297(9), 1734–1746. <http://doi.org/10.1002/ar.22970>

Elias, J. A., Zhu, Z., Chupp, G., & Homer, R. J. (1999). Airway remodeling in asthma. *Journal of Clinical Investigation*, 104(8), 1001–1006.

Fahy John V. (2015). Type 2 inflammation in asthma present in most, absent in many. *NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY*, vol. 15, pp. 57-65.

Fredberg, J. J. (2001). Airway obstruction in asthma: ¿does the response to a deep inspiration matter? *Respiratory Research*, 2(5), 273–275. <http://doi.org/10.1186/rr68>

Fumio Matsumura and David J. (2008). Hartshorne. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 25; 369(1): 149–156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2367208/>

Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, (2017). Available from: www.ginasthma.org

Grootendorst D. C. and Rabe K. F. (2004). Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. Vol.1, No.2 pp.77-87.

Guiting Lin, Thomas M. Fandel, Alan W. Shindel, Guifang Wang, Lia Banie, Hongxiu Ning, Tom F. Lue and Ching-Shwun Lin. (2010). Modulation of smooth muscle tonus in the lower urinary tract: interplay of myosin light-chain kinase (MLCK) and MLC phosphatase (MLCP). *BJU INTERNATIONAL*. E66-E70.

H. Meurs, R. Gosens and J. Zaagsma. (2008). Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. *EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL*. Vol. 32, num. 2. Pp. 487-502

Hamelmann E. S., Takeda K., Oshiba A., Larsen G., Irvin C. and Gelfan E. (1977). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, 776-765.

Harver Andrew and Kotses Harry. (2010). *Asthma, Health and Society: A Public Health Perspective*. New York: Springer.

Heung-Mook Shin, Hyun-Dong Je, Cynthia Gallant, Terence C. Tao, David J. Hartshorne, Masaaki Ito, Kathleen G. Morgan. (2002). Differential association and

localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circulation Research*.
<http://circres.ahajournals.org/content/90/5/546.long>

Hilgers R. and Weeb R. (2005). *Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho*. Department of Physiology, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia 30912

Holgate Stephen T., Wenzel Sally, Postma Dirkje S., Weiss Scott T., Renz Harald and Sly Peter D. (2015). Asthma. *NATURE REVIEWS, DISEASE PRIMERS*, (1), pp. 1-22

Jianhua Feng, Masaaki Ito, Kazuhito Ichikawa, Naoki Isaka, Masakatsu Nishikawa, David J. Hartshorne and Takeshi Nakano. (1999). Inhibitory Phosphorylation Site for Rho-associated Kinase on Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTR*, Vol. 274, No. 52, Issue of December 24, pp. 37385–37390. USA.

Jude, J., Koziol-White, C., Scala, J., Yoo, E., Jester, W., Maute, C., Panettieri, R. (2016). Formaldehyde Induces Rho-Associated Kinase Activity to Evoke Airway Hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(4), 542–553. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0254OC>

Kasahara, D. I., Mathews, J. A., Park, C. Y., Cho, Y., Hunt, G., Wurmbrand, A. P., Shore, S. A. (2015). ROCK insufficiency attenuates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(7), L736–L746. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00372.2014>

Kasahara, D. I., Ninin, F. M. C., Wurmbrand, A. P., Liao, J. K., & Shore, S. A. (2015). Abrogation of Airway Hyperresponsiveness but not Inflammation by Rho kinase Insufficiency. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(2), 457–470. <http://doi.org/10.1111/cea.12438>

Lange Peter. (2013). Persistent Airway Obstruction in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol. 187, No.1.

Larenas-Linnemann D., Hernandez J., Vázquez J., Ortiz I., Fernández M., Del Río B., Cano M., Luna J., Ortega J., Romero J., López E., Villaverde J., Mayorga J. (2017). Guía Mexicana del Asma (GIMA). *Rev Alerg Mex.* 2017;64 Supl 1:s1-s128.

López J. y Fernández A. (2008). *Fisiología del ejercicio*. 3° ed. Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. 1008 pp.

Makoto Kudo, Yoshiaki Ishigatsubo and Ichiro Aoki. (2013). Pathology of asthma. *Front. Microbiol.*, 10 September. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00263>

Masumi Eto, Jason A. Kirkbride, David L. Brautigan. (2005). Assembly of MYPT1 with protein phosphatase-1 in fibroblasts redirects localization and reorganizes the actin cytoskeleton. Published online in Wiley InterScience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106448>

Mendez J., Huerta J., Bellanti J., Ovilla R., Escobar A. (2008). *Alergias. Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos*. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. México, 484 p.

Meng S., Page R. and Wolfgang P. (2012). Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins. *Journal Bioquimical Society*. <http://www.biochemsoctrans.org/content/40/5/969.article-info>

Mukta Khasnis, Akiko Nakatomi, Kristyn Gumpfer and Masumi Eto. (2014). Reconstituted Human Myosin Light Chain Phosphatase Reveals Distinct Roles of Two Inhibitory Phosphorylation Sites of the Regulatory Subunit, MYPT1. *Biochemistry, American Chemical Society*. 53, 2701–2709. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi5001728>

Ning Gao, Ming-Ho Tsai, Audrey N. Chang, Weiqi He, Cai-Ping Chen, Minsheng Zhu, Kristine E. Kamm and James T. Stull. (2017). Physiological vs. pharmacological signalling to myosin phosphorylation in airway smooth muscle. *The Journal of Physiology*. Pp 6231–6247.

Ouedraogo N, Roux E (2014) Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *J Pulm Respir Med* 4:221 doi:10.4172/2161-105X.1000221.

Patel K. N. and Chorawala M. R. (2011). Animals models of Asthma. Journal of Pharmaceutical Research And Opinion 1: 5,139 – 147.

Ryan, T., Shelton, M., Lambert, J.-P., Malecova, B., Boisvenue, S., Ruel, M., ... Skerjanc, I. S. (2013). Myosin Phosphatase Modulates the Cardiac Cell Fate by Regulating the Subcellular Localization of Nkx2.5 in a Wnt/ROCK-dependent Pathway. Circulation Research, 112(2), 257–266. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.275818>

Sameh Magdeldin , Shymaa Enany , Yutaka Yoshida , Bo Xu , Ying Zhang , Zam Zureena , Ilambarthi Lokamani , Eishin Yaoita y Tadashi Yamamoto. (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. Clin Proteomics, BioMed Central; 11 (1): 16.

Sanderson M., Delmotte P., Bai Y. and Perez J. (2008). Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Contractility by Ca²⁺ Signaling and Sensitivity. PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY VOL 5

Shichi, D., Arimura, T., Ishikawa, T., & Kimura, A. (2010). Heart-specific Small Subunit of Myosin Light Chain Phosphatase Activates Rho-associated Kinase and Regulates Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1. The Journal of Biological Chemistry, 285(44), 33680–33690. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.122390>

Sminkey Laura. (2017). Chronic Respiratory Diseases Asthma. Ginebra Suiza. World Health Organization Recuperado de <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>

Sommer B. and Carvajal V. (2009). La inhibición de la cinasa de Rho como posible terapia de la hiperreactividad bronquia. REV INST NAL ENF RESP MEX VOLUMEN 22 - NÚMERO 2. Pp.101-108.

Sorenson R.L. and Brejel T.C. (2014). Atlas of Human Histology. Virtual histology laboratory. University of Minnesota. <http://www.histologyguide.com/about-us/Brelje.html>

Tortora, D. (2006) Principios de anatomía y Fisiología. Recuperado de <https://mianatomia.wordpress.com/2014/11/12/la-importancia-del-musculo-liso/>

Trent Butler, Jonathan Paul, Nick Europe-Finner, Roger Smith and Eng-Cheng Chan. (2013). Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C485–C504. <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpcell.00161.2012>

Vargas Becerra Mario Humberto. (2009). Epidemiología del Asma. *Neumología y Cirujía de Tórax*, 68, pp.91-97.

Varki A, Gagneux P. Funciones biológicas de los glicanos. (2017). En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., Editores. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3ª edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Capítulo 7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453034/> doi: 10.1101 / glycobiology.3e.007

Victoria Pando Robles y César Ferreira Batista. (2014). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotechnología V14 CS3.indd* 98. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_09.pdf

Welsch Ulrich. (2008). *Histología*. 2ª Ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

Xiuyue Jia, Yang Gu Lynn J., Groome Mahmoud Al-Kofahi J., Steven Alexander, Weimin Li Yuping Wang. (2016). 1,25(OH)₂D₃ Induces Placental Vascular Smooth Muscle Cell Relaxation by Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1Ser507: Potential Beneficial Effects of Vitamin D on Placental Vasculature in Humans. *Biology of Reproduction*, Volume 94, Issue 5, 1. 116, 1-8.

Xiuyue Jia, Yang Gu, Lynn J. Groome, Mahmoud Al-Kofahi, J. Steven Alexander, Weimin Li, Yuping Wang. (2016). 1,25(OH)₂D₃ Induces Placental Vascular Smooth Muscle Cell Relaxation by Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1Ser507: Potential Beneficial Effects of Vitamin D on Placental Vasculature in Humans, *Biology of Reproduction*, Volume 94, Issue 5, 116, 1–8, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138362>

Yan-Ning Qiao, Wei-Qi He, Cai-Ping Chen, Cheng-Hai Zhang, Wei Zhao, Pei Wang, Lin Zhang, Yan-Ze Wu, Xiao Yang, Ya-Jing Peng, Ji-Min Gao, Kristine E. Kamm,

James T. Stull and Min-Sheng Zhu. (2014). Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Regulates the Contraction and Relaxation of Vascular Smooth Muscle and Maintains Blood Pressure. *The Journal of Biological Chemistry*. 289, 22512-22523.

Yoshihiko Chiba, Ayako Ueno, Koji Shinozaki, Hisao Takeyama, Shuji Nakazawa, Hiroyasu Sakai and Miwa Misawa. (2005). Involvement of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Respiratory Research*. <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-6-4>

Yue Wu, Andrea Mura Nyl, Ferenc Erdodi and David J. Hartshorne. (2005). Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. Pp. 123-134. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10974-005-2579-5>

Zamudio-Arroyo José Manuel, Peña-Rangel María Teresa y Riesgo-Escovar Juan Rafael. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 15, núm. 2, pp. 133-141. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.redalyc.org/pdf/432/43228286001.pdf>