



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Papel de las proteínas ROCK1, ROCK2, MYPT1 y
SERCA2b en la regulación de la hiperreactividad en el
asma.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELIZABETH ESLAVA DE JESÚS



**DIRECTOR DE TESIS:
Biol. Marisol Alvarez González
Ciudad de México, 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

ÍNDICE	Pag
ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura de las vías aéreas.....	1
1.2. Definición y epidemiología del asma.....	3
1.3. Características del asma.....	5
1.4. Contracción del músculo liso.....	7
1.5. Subunidad reguladora de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MYPT1).....	10
1.6. Sensibilidad al Ca ²⁺	11
1.6.1. Proteína cinasa asociada a Rho (ROCK).....	12
1.7 ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico (SERCA).....	14
1.8. Respuesta alérgica en cobayo.....	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos particulares.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODO	20
5.1 Cobayos.....	20
5.2 Pletismografía barométrica.....	20
5.3 Modelo agudo de asma alérgica.....	22

5.4 Grupos experimentales.....	24
5.5 Inmunohistoquímica.....	26
5.6 Análisis de expresión digital por píxeles en el programa ImageJ-Fiji.....	26
5.7 Análisis estadístico.....	26
6. RESULTADOS	28
6.1 Reactividad de las vías aéreas en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	28
6.2 Expresión y localización de MYPT1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	29
6.3 Expresión y localización de MYPT1-Thr ⁶⁹⁶ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	30
6.4 Expresión y localización de MYPT1-Thr ⁸⁵⁰ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	31
6.5 Expresión y localización de ROCK1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	32
6.6 Expresión y localización de ROCK2 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	33
6.7 Expresión y localización de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	34
6.8 Correlación entre la reactividad y la expresión de las proteínas MYPT1, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b en musculo liso de las vías aéreas de cobayos control, con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.....	35

7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES.....	42
9. PERSPECTIVAS.....	42
10. REFERENCIAS.....	43

ABREVIATURAS

<u>Abreviaturas</u>	<u>Significado</u>
ATP	Adenosín trifosfato
BPT	Test de Provocación Bronquial por sus siglas en inglés <i>Bronchial Provocation Test</i>
Ca ²⁺	Ión Calcio
([Ca ²⁺] _i)	Calcio intracelular
CAM	Proteína citosólica calmodulina
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en un segundo
GEMA	Guía Española para el Manejo de Asma
GDP	Guanosín Difosfato
GINA	Iniciativa Global por el Asma por sus siglas en inglés <i>Global Initiative for Asthma</i>
GTP	Guanosín Trifosfato
GUIMA	Guía Mexicana del Asma

IgE	Inmunoglobulina E
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
KDa	Kilodaltons, unidad de peso molecular proteico
MHC	Cadena pesada de la Miosina por sus siglas en inglés <i>Myosin Heavy Chain</i>
MLC	Cadena ligera de la Miosina por sus siglas en inglés <i>Myosin Light Chain</i>
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina por sus siglas en inglés <i>Myosin Light Chain Kinase</i>
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina por sus siglas en inglés <i>Myosin Light Chain Phosphatase</i>
MMP-1	Metaloproteinasa de matriz-1 por sus siglas en inglés <i>Matrix Metalloproteinase-1</i>
MYPT1	Subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina 1 por sus siglas en inglés <i>Myosin</i>

Phosphatase Regulatory subunit 1

O2

Ion Oxígeno

ROCK

Proteína Cinasa asociada a Rho

ROCK1

Proteína Cinasa asociada a Rho Isoforma 1

ROCK2

Proteína Cinasa asociada a Rho Isoforma 2

SSF

Solución Salina Fisiológica

TNF- α

Factor de Necrosis Tumoral- α

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de las vías aéreas.
- Figura 2.** Incidencia del asma en los diferentes estados de la república mexicana.
- Figura 3.** Hiperreactividad de las vías aéreas.
- Figura 4.** Contracción del músculo de las vías aéreas.
- Figura 5.** Isoformas de la Subunidad reguladora de la Fosfatasa 1
- Figura 6.** Expresión y localización de las isoformas de ROCK.
- Figura 7.** Dominios funcionales de las isoformas de ROCK.
- Figura 8.** Estructura de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA)
- Figura 9.** Isoformas y variantes de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico SERCA.
- Figura 10.** Pletismografía
- Figura 11.** Calendario de sensibilización antigénica
- Figura 12.** Día 8, refuerzo antigénico
- Figura 13.** Reactividad de las vías aéreas inducida por el reto antigénico con OVA en cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores.
- Figura 14.** Expresión y localización de MYPT1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores.
- Figura 15.** Expresión y localización de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.
- Figura 16.** . Expresión y localización de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.
- Figura 17.** Expresión y localización de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.
- Figura 18.** Expresión y localización de ROCK2 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.
- Figura 19.** Expresión y localización de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.
- Figura 20.** Correlación entre la expresión de MYPT1, MYPT1-Thr⁶⁹⁶, MYPT1-Thr⁸⁵⁰, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b y la hiperreactividad de las vías aéreas.

RESUMEN

La hiperreactividad es un mecanismo caracterizado por una contracción excesiva del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) en respuesta a diversos estímulos contráctiles, presente en diversas afectaciones pulmonares, siendo una de las principales características en el asma. Algunas de las proteínas involucradas en la maquinaria principal de la contracción, son la proteína cinasa asociada a Rho en sus isoformas 1 y 2 (ROCK1, ROCK2), encargada de regular a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2b), proteína transmembranal que regula las concentraciones intracelulares de calcio durante la contracción y la relajación muscular, y la subunidad reguladora de la fosfatasa 1 de la cadena ligera de la miosina (MYPT1), presente sin ser fosforilada o presentando fosforilaciones en ciertos aminoácidos, tales como el residuo de treonina 696 (Thr⁶⁹⁶) y la treonina 853 (Thr⁸⁵³), fosforilaciones que han sido relacionadas con la inhibición de la actividad de la fosfatasa durante el proceso de contracción del músculo liso. Por lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue determinar la expresión y localización de algunas proteínas involucradas en el mecanismo de la contracción del MLVA y su relación con la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo, así como en grupos de cobayos con respuesta variable y no respondedores. Para ello, cobayos machos fueron sensibilizados y sometidos a tres retos antigénicos con ovoalbúmina (OVA), seguido de una evaluación de la reactividad de las vías aéreas a través de curvas de histamina. A partir de lo anterior, se obtuvieron tres grupos de cobayos con diferente respuesta a los retos antigénicos con OVA, clasificando a aquellos cobayos que respondieron a los tres retos antigénicos como cobayos con modelo de asma (MA), aquellos cobayos que pudieron o no responder a los tres retos antigénicos nombrados como cobayos con respuesta variable (RV) y el grupo de cobayos del cual no se obtuvo respuesta en ningún reto identificados como cobayos no respondedores (NR). Un análisis de expresión digital mediante el programa ImageJ-Fiji evaluó la expresión relativa de las proteínas presentes en el MLVA, observando un aumento significativo de la expresión de ROCK2 en los tres grupos de cobayos con MA, RV y NR, mientras que MYPT1 y su forma fosforilada MYPT1-

MYPT1-Thr⁸⁵⁰ no se observaron cambios significativos con respecto al grupo control. A diferencia de lo anterior, la forma fosforilada MYPT1-Thr⁶⁹⁶ disminuyó su expresión en cobayos NR y la proteína SERCA2b aumentó significativamente en cobayos con RV y NR en comparación con los cobayos del grupo control. De igual forma, se identificó una correlación negativa entre el aumento de la hiperreactividad y la expresión de la isoforma ROCK2. En conclusión, la proteína ROCK2 vuelve a ser identificada como mediador del aumento y regulación de la hiperreactividad en el músculo liso de las vías aéreas en el asma. De igual forma, la expresión de la maquinaria contráctil en el grupo de cobayos con RV estaría dilucidando el establecimiento y activación de algunas de las proteínas principales e indispensables para la contracción del MLVA, lo que implicaría la facilidad con la que algunas veces los cobayos puedan responder a los retos antigénicos. Sin embargo, la razón por la cual no podrían estar respondiendo al reto antigénico aún queda por ser resuelta. Finalmente, se descarta una regulación de la hiperreactividad de las vías aéreas por parte de la proteína MYPT1 y sus formas fosforiladas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en el asma, así como de la proteína SERCA2b. Sin embargo, el aumento de expresión de SERCA2b en cobayos con RV y NR, podría estar sugiriendo una relación con la disminución de la obstrucción de las vías aéreas en el asma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura de las vías aéreas

Una de las funciones más importantes del aparato respiratorio es la conducción del oxígeno desde el exterior del cuerpo hacia el interior del mismo por medio de los conductos conocidos como vías aéreas, cuya finalidad recae en la transferencia del O₂ presente en el aire hacia los glóbulos rojos que se encuentran en la sangre. Las vías aéreas pueden ser definidas como ramificaciones de tubos estrechos, cortos y numerosos que penetran profundamente los pulmones (West J., 2012), las cuales pueden ser clasificadas en dos grupos: por un lado, se encuentran las vías aéreas superiores formadas por la cavidad nasal, faringe y laringe y por el otro podemos agrupar a las vías aéreas inferiores conformadas por la tráquea, los bronquios, bronquiolos y los alvéolos pulmonares (Figura 1) (Rodríguez-Pinto M., 2005).

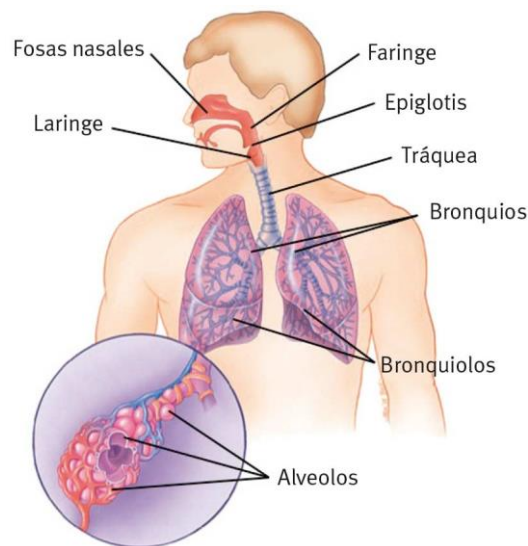


Figura 1. Estructura de las vías aéreas. Vías aéreas superiores: faringe y la laringe, Vías aéreas inferiores: tráquea, bronquios, bronquiolos y alveolos. *Esquema tomado de Torrealba-Rodríguez V. et. al, 2014.*

La cavidad nasal tiene como función principal humedecer y calentar el aire, así como aumentar la resistencia de la vía aérea (Sologuren N., 2009). Las células de la mucosa nasal cuentan con cilios vibrátiles en la superficie, de tal modo que al moverse sirven para detener y expulsar el polvo del aire atmosférico, además, tienen la capacidad de secretar moco, el cual funciona como una barrera al permitir la adherencia de partículas extrañas (Rodríguez-Pinto M, 2005).

La faringe es una estructura tubular formada por el músculo constrictor superior, el músculo constrictor medio y el músculo constrictor inferior. Dichos músculos se superponen a modo de capas que al contraerse permiten el paso del bolo alimenticio hacia el esófago (Sologuren N., 2009; Asenjo C. y Pinto R., 2017). Por lo tanto, la faringe es una estructura que combina funciones del aparato respiratorio y el aparato digestivo (García-Araque H. y Gutiérrez-Vidal S., 2015).

Debajo de la faringe se encuentra la laringe que es una estructura cartilaginosa que presenta una doble función, dar paso al aire protegiendo a la tráquea y modular los sonidos mediante la fonación. La laringe está compuesta por la epiglotis, una estructura cartilaginosa que se cierra durante la deglución (Rodríguez-Pinto M., 2005). Después de la glotis se encuentra una estructura cartilaginosa formada por 15-20 anillos incompletos llamada tráquea. En la tráquea, dichos anillos están unidos por tejido conjuntivo que le proporciona elasticidad y rigidez (García-Araque H. y Gutiérrez-Vidal S., 2015; Rodríguez-Pinto M., 2005). La parte final de la tráquea denominada carina, se divide en dos bronquios principales: el bronquio derecho y el bronquio izquierdo. Cada bronquio principal se divide en dos bifurcaciones llamadas bronquios segmentarios y éstos a su vez en bronquiolos terminales, que se antepone a los bronquiolos respiratorios, los cuales llegan hasta los conductos alveolares que se encuentran alineados con los alveolos. En los alvéolos se lleva a cabo el intercambio gaseoso, razón por la cual se le da el nombre de zona respiratoria (West J., 2012). Finalmente, los alvéolos pulmonares han sido descritos como pequeños sacos formados por una delgada capa de células, la cual está rodeada por los vasos capilares de la circulación pulmonar. Al conjunto de estos alvéolos se le conoce como pulmones (Rodríguez-Pinto M., 2005). El pulmón es un órgano par que se encuentra localizado en cada hemitórax, el pulmón derecho está dividido en un lóbulo superior, un lóbulo medio y un lóbulo inferior, mientras que el pulmón izquierdo solamente se divide en un lóbulo superior y un lóbulo inferior. (Rodríguez-Pinto M., 2005). Ambos pulmones llevan a cabo dos funciones principales en relación al intercambio de gases, por un lado, realizan la inspiración, lo que facilita la entrada del aire, y por otro lado, realizan la espiración, definida como la expulsión del aire hacia el exterior del cuerpo (García-Araque H. y

Gutiérrez-Vidal S., 2015). Otro punto importante característico de los pulmones es la circulación, la cual consta de dos componentes. El primero se encarga de la irrigación de las vías de conducción y el segundo es el causante de llevar el gasto cardiaco a las redes capilares para el intercambio gaseoso. (García-Araque H. y Gutiérrez-Vidal S., 2015). El aparato respiratorio puede estar involucrado en diferentes enfermedades que se relacionan directamente con las vías aéreas. Dichas enfermedades pueden ir desde una ligera infección respiratoria hasta enfermedades crónicas como el asma.

1.2. Definición y epidemiología del asma

El asma es una enfermedad que actualmente afecta a cerca de 300 millones de personas en el mundo, en donde los grupos de mujeres adultas y los niños varones son las poblaciones más vulnerables (Braman SS., 2006). No existe una definición que describa por completo al asma, ya que se considera una enfermedad multifactorial (Del Río-Navarro B. et. al, 2009). Incluso, a pesar de que el asma se ha estudiado desde hace cerca de cien años, aún se encuentra abierta la discusión sobre catalogarla como una enfermedad o como un síndrome (Ocampo J., Gaviria R. y Sánchez J., 2017). La GINA (GINA, por sus siglas en inglés *Global Initiative for Asthma*) 2018, establece que el asma es una enfermedad heterogénea caracterizada por la inflamación crónica de las vías aéreas, definida por el historial de los síntomas característicos, tales como opresión en el pecho, las sibilancias, la dificultad para respirar y la tos, los cuales pueden variar tanto en tiempo como en intensidad (GINA, 2018).

Muchos factores pueden desencadenar el asma y pueden ser tanto genéticos como ambientales, tales como el ejercicio, los cambios drásticos de clima, infecciones respiratorias o la exposición a algún alérgeno o irritante (GINA, 2018). Dichos factores pueden interaccionar entre sí y generar la sintomatología típica del asma (Callén-Blecua M. y Mora-Gandarillas I., 2017).

Hoy en día no hay pruebas o criterios de diagnóstico estándar para el asma, por ello el diagnóstico resulta un reto para los médicos. En México existe la Guía Mexicana del asma (GUIMA) en donde se recomiendan algunos parámetros para el

diagnóstico de la enfermedad (GUIMA, 2017). Por lo anterior, en los últimos años se han propuesto otras medidas para el diagnóstico del asma, como el uso de marcadores biológicos, los cuales presentan cierta homogeneidad de expresión y una menor dependencia de los criterios subjetivos. A pesar de las ventajas que presentan los marcadores biológicos, su uso aún sigue en debate (Ocampo J. et al., 2017).

Estudios recientes han estimado que aproximadamente un 4.3% de la población mundial padece de asma. Sin embargo, estos resultados de prevalencia pueden variar dependiendo de la población que se estudie y de la metodología utilizada (Loftus PA. y Wise Sk., 2016). Los datos obtenidos para México entre los años 2003-2007 arrojaron que la incidencia promedio de asma fue mucho mayor en los estados de Tabasco y Yucatán, mientras que los estados de Puebla y Tlaxcala presentaron la menor incidencia (Figura 2) (Vargas-Becerra M., 2009).

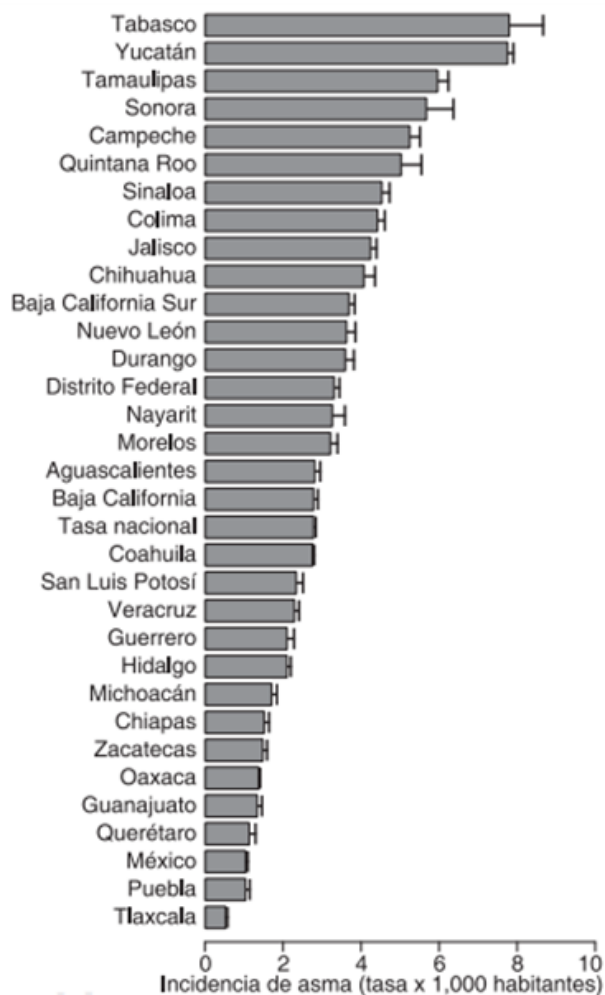


Figura 2. Incidencia del asma en los diferentes estados de la república mexicana. Gráfica de la incidencia de asma entre los años 2003 a 2007 en México. Tlaxcala presenta menor incidencia de asma contrario a los estados de Tabasco y Yucatán, estados con mayor incidencia en estos años. Tomado de Vargas-Becerra M., 2009

En los últimos años, se ha observado un descenso en la incidencia del asma. Sin embargo, lo anterior no ocurre en todos los países, ya que principalmente se identifica en los países desarrollados, mientras que en los países en vías de desarrollo ocurre lo contrario (Vargas-Becerra M., 2009).

1.3. Características del asma

A lo largo de los años, la hiperreactividad de las vías aéreas se ha considerado como una característica distintiva para diversas afecciones pulmonares, incluyendo

el asma. Por lo anterior, su medición ha sido de suma importancia, ya que proporciona conocimientos fisiopatológicos del asma (Chapman D. e Irvin C., 2016).

La hiperreactividad se define como una broncoconstricción excesiva de las vías aéreas, es decir, un estrechamiento excesivo de las vías aéreas debido a una contracción exagerada del músculo liso de las vías aéreas, el cual genera la limitación del flujo de aire, en respuesta a una variedad de estímulos que pueden o no ser inhalados. Aunque la hiperreactividad se ha tomado como una característica distintiva del asma, es importante tomar en cuenta que también puede presentarse en otras enfermedades, tales como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la fibrosis quística, así como en personas que fuman o han dejado de fumar, entre otros (Borak J. y Lefkowitz RY., 2016). El interés por el estudio de la hiperreactividad de las vías aéreas y la heterogeneidad de los mecanismos que presenta, es una pieza clave para su comprensión (Chapman D. e Irvin C., 2016).

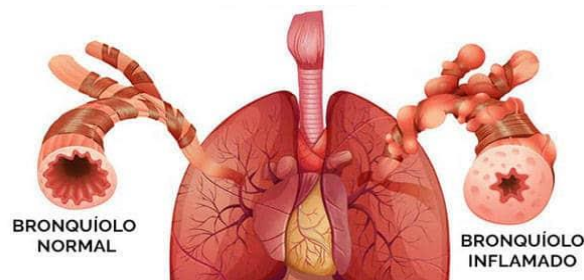


Figura 3. Hiperreactividad de las vías aéreas. Diferencia entre un bronquiolo de una persona sana (lado izquierdo, bronquiolo normal) comparado con un bronquiolo de una persona asmática con aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas e inflamación (lado derecho, bronquiolo inflamado) Modificado de <https://www.istockphoto.com/es/vector/asma-bronquial-gm527235259-53301774> .

La hiperreactividad ha sido asociada con los cambios estructurales de las vías aéreas en pacientes con asma crónica que presentan limitación fija del flujo de aire. Dichos cambios incluyen el engrosamiento y aumento significativo en el músculo liso de las vías aéreas, tal como se muestra en la Figura 3. De esta manera, un engrosamiento en la membrana basal, fibrosis subepitelial, alteraciones en la matriz extracelular, proliferación vascular e hipertrofia glandular son las principales características que se presentan generalmente en pacientes con asma (Cockcroft D.W. y Davis B., 2006). Por otro lado, la inflamación crónica en el asma, a su vez,

es una característica que se presenta como resultado de la liberación de proteínas inflamatorias, las cuales se sugiere que contribuyen a su vez al desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas (Chapman D. e Irvin C., 2016).

Otra de las características importantes que se presenta en el asma es la broncoconstricción, la cual es producto directo de la contracción del músculo liso que rodea a las vías aéreas. La funcionalidad anormal del músculo liso de las vías aéreas es un factor importante que se presenta dentro de la enfermedad del asma y puede deberse tanto a factores intrínsecos propios del músculo liso de las vías aéreas, tales como la diferencia de expresión de proteínas contráctiles y la gravedad de la hiperreactividad (Slats A.M., et al., 2008), así como a factores extrínsecos relacionados con el ambiente en donde se encuentra el paciente con asma. (Chapman D. e Irvin C., 2016).

En la actualidad aún no se comprenden del todo los mecanismos de la hiperreactividad y no se conocen métodos técnicos para su medición que nos otorguen los mejores resultados de diagnóstico. Sin embargo, las evidencias de diversos estudios sugieren que en un futuro se pueda partir de fenotipos de broncoconstricción a fenotipos clínicos. De la misma forma, también es fundamental conocer a detalle el papel del mecanismo de la contracción del músculo liso en el asma ya que posiblemente esté relacionado con la hiperreactividad de las vías aéreas (Chapman D. e Irvin C., 2016).

1.4. Contracción del músculo liso.

El músculo está formado por células llamadas miocitos, agrupados en fibras musculares; las cuales se disponen de forma paralela de tal manera que forman haces o láminas, cuya principal característica es la capacidad de contracción. Existen 3 tipos de músculo: 1) músculo esquelético formado por células son largas y estriadas, que se encuentran conectadas a los huesos generalmente por medio de los tendones. 2) Músculo cardíaco conformado por células llamadas cardiomiocitos las cuales, al igual que las células del músculo esquelético tienen estriadas, pero son cortas y ramificadas. Y 3) Músculo liso presenta células en forma de elipse alargado sin bandas transversales. Dicho músculo se encuentra en

órganos que no requieren movimientos voluntarios como por ejemplo en los vasos sanguíneos, el intestino y las vías aéreas (Megías M. et al., 2017).

Las vías aéreas están conformadas por músculo liso, que, a diferencia de los músculos esquelético y cardíaco, carece de estrías (Clinton-Webb R., 2003). Existen dos configuraciones básicas de la musculatura de las vías aéreas; la primera se encuentra en la tráquea, en donde el músculo liso se inserta en el cartílago asociándose tanto de forma anatómica como funcional. Cabe mencionar que hace años se creía que la musculatura de la tráquea desempeñaba un papel menor tanto en la fisiología como en la patología de las vías aéreas (Gabella G., 1994). Sin embargo, en estudios recientes han demostrado la importancia del músculo liso de la tráquea en modelos de asma animal (Álvarez-Santos M., 2017). Por otro lado, la segunda configuración muscular, se presenta en los bronquiolos, en donde el músculo liso se encuentra de forma interna, muy cerca del epitelio (Gabella G., 1994).

El músculo liso de las vías aéreas puede contraerse bajo ciertas condiciones y/o estímulos (Figura 4) (Gabella G., 1994) y tanto la cantidad de músculo liso en los bronquios como la contracción del mismo, aumenta en pacientes con asma, lo cual respalda la idea de que una mayor cantidad de músculo liso contribuye en gran medida a la hiperreactividad bronquial (Gabella G., 1994).

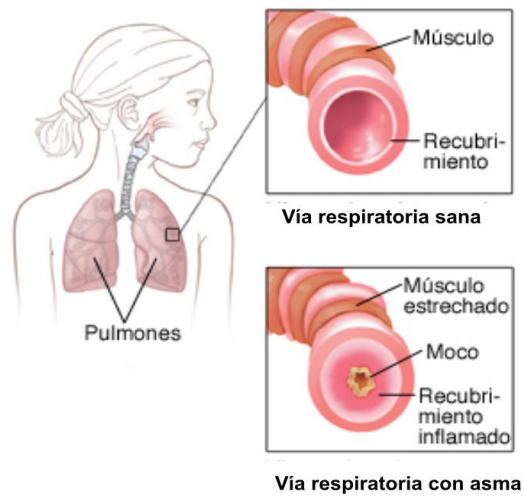


Figura 4. Contracción del músculo liso de las vías aéreas. En una persona asmática se genera un estrechamiento de las vías aéreas producto de la contracción del músculo liso de las vías aéreas (vía respiratoria con asma) comparado con las vías aéreas de una persona sana (Vía respiratoria sana). Modificado de <https://mychart.geisinger.org/staywel/html/Inpatient/3,40856.html>

A pesar que desde hace tiempo se reconoce que el MLVA juega un papel importante en la hiperreactividad, no está del todo clara su participación (SS. Ann., 2007).

La contracción del MLVA implica la formación de puentes cruzados de actomiosina de acuerdo con la velocidad de su formación. Dicha velocidad de formación es dependiente tanto de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK por sus siglas en inglés: *Myosin Light Chain Kinase*), como por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP por sus siglas en inglés *Myosin Light Chain Phosphatase*). Un aumento de expresión de la MLCK o de la MLCP puede generar un incremento de la velocidad de acortamiento del MLVA, mecanismo que ha sido reportado en el asma (Chapman D. e Irvin C., 2016).

Es importante mencionar que la función contráctil del músculo liso no está bajo control voluntario, sino que se inicia por una asociación del calcio (Ca^{2+}) y la calmodulina (CAM) para activar a la MLCK y así estimular la fosforilación de la MLC cuando existe un aumento de Ca^{2+} . Cuando hay una disminución de Ca^{2+} se presenta una disminución de la activación de la MLCK y con ello un aumento en la actividad de la MLCP quien puede desfosforilar a la MLC, teniendo como

consecuencia inmediata la relajación del músculo liso. Lo anterior puede ocurrir mediante diferentes vías que se relacionan principalmente con la inhibición directa de la actividad de la fosfatasa MLCP, inhibiendo a su vez la relajación de la MLC (Clinton-Webb R., 2003).

1.5. Subunidad reguladora de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MYPT1)

La fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) es una holoenzima de 130 kDa constituida por tres subunidades: la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1c por sus siglas en inglés *Protein Phosphatase 1*), la cual constituye a la subunidad catalítica, una subunidad de 20 kDa llamada M20 cuya función es desconocida y una subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina 1 conocida como MYPT1 (Por sus siglas en inglés: *Myosin Phosphatase Regulatory subunit 1*), quien aumenta su actividad catalítica incrementando la especificidad de PP1c hacia la cadena reguladora de miosina (Qiao Y.N. et. al., 2014). A su vez, las subunidades PP1c y MYPT1 pueden interactuar con diversas proteínas, las cuales, permiten la regulación de la fosfatasa MLCP por diferentes vías de señalización, principalmente a través de la activación e inhibición de MYPT1 (Qiao Y.N. et. al., 2014).

Particularmente en los mamíferos, se sabe de la existencia de 5 subunidades reguladoras de la fosfatasa MLCP. Dichas subunidades reguladoras son MYPT1, MYPT2, MBS85, MYPT3 y TIMAP (Figura 5) (Grassie M.E. et.al., 2011). Ésta familia de proteínas tiene funciones que son muy importantes en el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad de Parkinson y la hipertensión. Una proteína conocida como cinasa asociada a Rho (ROCK) ha sido ampliamente relacionada con la regulación de la expresión de diversas proteínas a través de la fosforilación en diversos residuos aminoácidos, incluyendo a las subunidades reguladoras de la fosfatasa MYPT1, MYPT2 y MBS85. Específicamente, el papel de ROCK que se presenta dentro de la activación de la isoforma de MYPT1, ha sido especialmente importante, ya que la fosforilación dada en los residuos de treonina 696 (MYPT1-Thr696) y la treonina 853 (MYPT1-Thr853), da como resultado ciertas formas fosforiladas de MYPT1 que se relacionan con la inhibición directa de la

subunidad reguladora y por consiguiente con la inhibición de la actividad de la fosfatasa durante el proceso de contracción del músculo liso (Wang F. y Sun Y., 2018).

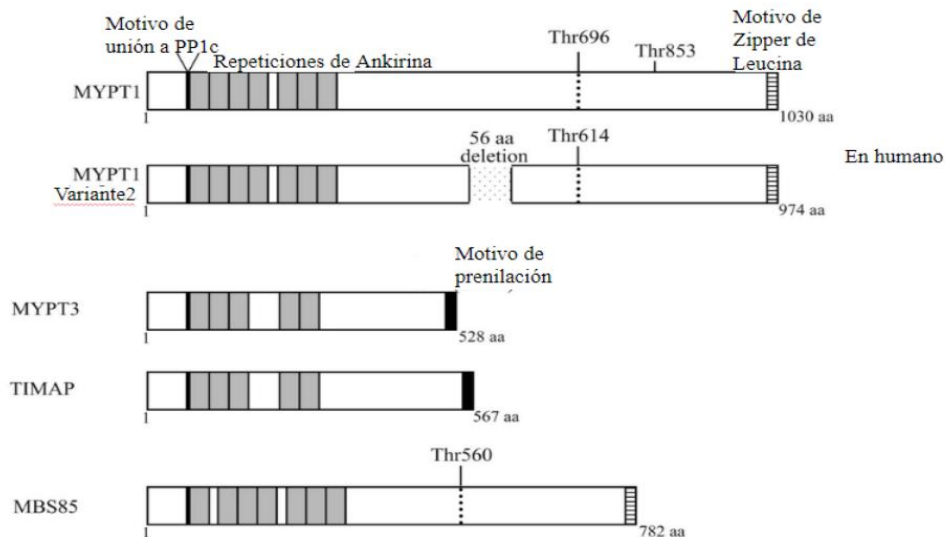


Figura 5. Isoformas de la Subunidad reguladora de la Fosfatasa 1. Se muestra que existen 5 isoformas las cuales difieren en la presencia de un inserto central y un motivo de zipper de leucina en su región carboxilo terminal. *Modificado de Dimitrievich-Verin A., 2007.*

1.6. Sensibilidad al calcio

La regulación de la fosfatasa MLCP depende de la actividad de varias cinasas y fosfatasas, que en su mayoría son independientes de las concentraciones de calcio intracelular, mecanismo conocido como sensibilidad al calcio (SS Ann., 2007).

Durante el proceso de contracción del músculo liso, el Ca^{2+} participa como iniciador formando un complejo con la calmodulina (CAM) conocido como complejo calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$). Este complejo es el activador de la cinasa MLCK, la cual fosforila a la cadena ligera de miosina y da paso a la contracción del MLVA. Sin embargo, el aumento en la concentración de calcio en la célula es transitorio, y la respuesta contráctil puede mantenerse debido al mecanismo de sensibilización al Ca^{2+} . Simultáneamente a la sensibilización al Ca^{2+} puede darse la activación de la proteína fosfolipasa C, lo que implica la activación de la proteína G pequeña de unión a GTP: RhoA, llevada a cabo por el factor de intercambio de nucleótidos de

guanina (Rho GEF) (Clinton-Webb R., 2003). El intercambiador GEF es un catalizador de afinidad de las GTPasas por GTP o GDP en la migración de RhoA hacia la membrana plasmática (Arias-Palomo E., 2008).

1.6.1. *Proteína cinasa asociada a Rho (ROCK)*

El principal efector de RhoA es la proteína cinasa asociada a Rho, también llamada ROCK (por sus siglas en inglés *Rho-associated coiled-coil containing kinases*), la cual es expresada en mamíferos, tales como el humano, los roedores y en algunos invertebrados como la mosca. Su peso molecular en humanos es de 158 KDa y está involucrada en varias funciones a nivel celular, como la regulación del citoesqueleto de actina-miosina (Julian L. y Olson M., 2014), la proliferación y migración celular, así como en la contracción del músculo liso (Zhu M. et al., 2011). ROCK puede expresarse en dos isoformas: ROCK1, también llamada Rho cinasa β , ROK β o p160ROCK y ROCK2 también conocida como ROK. Estas dos isoformas cuentan con el 64% de identidad en cuanto a las secuencias primarias de sus aminoácidos, un 54% de homología en sus dominios en espiral y un 92% en homología de sus dominios cinasa (Julian L. y Oslon M., 2014), pero su expresión en los tejidos es diferencial (Figura 6). ROCK1 puede ser observada abundantemente en hígado, estómago, bazo y riñón, mientras que ROCK2 se expresa principalmente en cerebro y músculo (Zhu M. et al., 2011). Particularmente en pulmón, existe una mayor expresión de la isoforma ROCK1 con respecto a la isoforma de ROCK2. Además de la expresión tejido-específica, la localización subcelular de las isoformas es diferente, ya que ROCK1 se localiza en el citoplasma, membrana plasmática y centrosomas, mientras que ROCK2 se identifica en el núcleo, fibras de estrés, citoplasma y en el anillo que se forma durante la citocinesis (Julian L. y Oslon M., 2014).

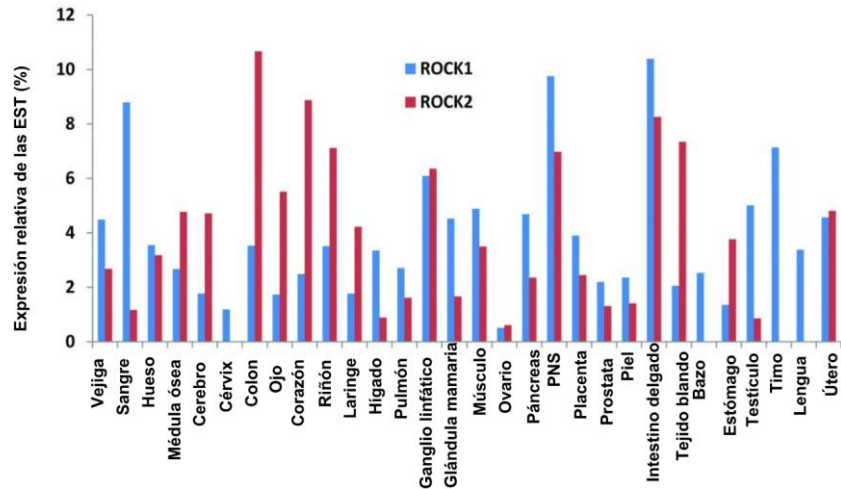


Figura 6. Expresión y localización de las isoformas de ROCK. Expresión relativa de las isoformas de ROCK (ROCK1 y ROCK2) de acuerdo a las etiquetas de secuencia expresada (EST) en diferentes órganos. *Modificado de Julian L. y Olson M., 2014.*

Estructuralmente, ambas isoformas son muy parecidas (Figura 7) puesto que cuentan con un dominio cinasa cercano al dominio amino-terminal, el cual lleva a cabo la fosforilación de las proteínas reguladas por ROCK, tal como MYPT1 de la MLCP y la activación de algunos inhibidores de la subunidad catalítica PP1c identificados como CPI-17 y PHI-1 (García C.C., 2006; Pagiatakis C. et al., 2012). El dominio cinasa es seguido por una región hélice α -anfipática central que conforma la región de espiral enrollada. Dentro de esta región de espiral, se encuentra el dominio RBD, conocido por ser el dominio de unión canónico de Rho, el cual se une exclusivamente con las regiones I y II del interruptor de RhoA y RhoC en su estado activo, es decir, cuando se encuentran unidos a GTP (García C.C., 2006). En la región del carboxilo terminal, se posiciona el dominio CDR, similar a un dedo de zinc rico en cisteína, el cual se sabe está involucrado en funciones de reconocimiento del ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés *Ribonucleic acid*), en la unión al ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés *Deoxyribonucleic acid*), y en la coordinación de las interacciones de proteína-proteína, por mencionar algunos ejemplos (García C.C., 2006).

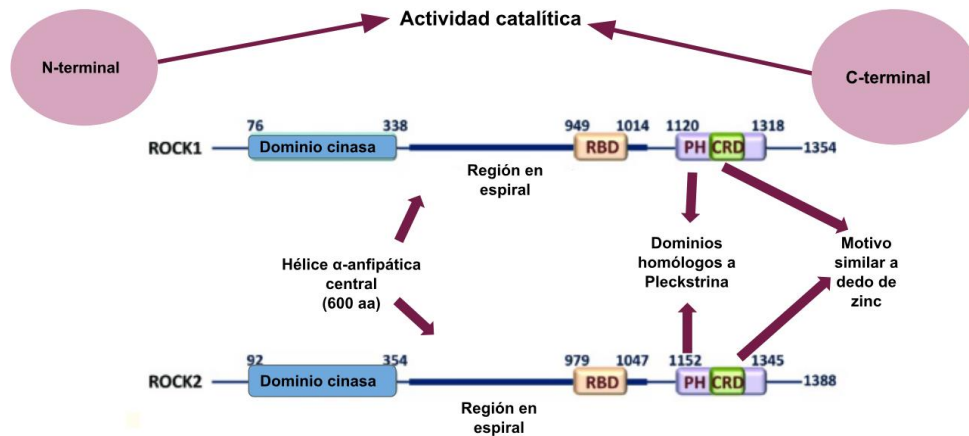


Figura 7. Dominios funcionales de las isoformas de ROCK. Ambas isoformas cuentan con un dominio cinasa, una región en espiral en la cual, casi al final se encuentra su dominio típico (RBD). Además de un motivo similar a un dedo de zinc en medio de un dominio homólogo a Pleckstrina (PH). *Modificado de Julian L. y Olson M., 2014.*

La activación de ROCK puede ser dada por la fosforilación en diversos residuos de aminoácidos, tales como los residuos de Tirosina-967, Serina-1099, Serina-1133 y Serina-1374 que se presentan en la isoforma ROCK2 (Julian L. y Olson M., 2014), mientras que su regulación negativa puede estar dada por otras proteínas de unión a GTP, como es el caso de la proteína Gem (Julian L. y Olson M., 2014; Ward Y. y Kelly K., 2006).

1.7. ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA)

Un mecanismo contrario a la contracción del músculo liso es relajación muscular. Dentro del proceso de relajación del MLVA se encuentra involucrada la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, mejor conocida como SERCA (por sus siglas en inglés *Sarcoendoplamic Reticulum Ca^{2+} ATPase*). SERCA es una proteína perteneciente a una familia de enzimas dependientes de ATP que se encargan de transportar Ca^{2+} hacia el interior del retículo sarcoplásmico (RS) (Reyes-Juárez J.L. y Zarain-Herzberg A., 2006). La ATPasa de Ca^{2+} SERCA tiene un peso de aproximadamente 110KDa y está constituida por 1000 aminoácidos; estructuralmente, sus extremos N-terminal y C-terminal son expuestos hacia el citoplasma y cuenta con 10 dominios transmembranales (Figura 8). Además, posee una cabeza globular que está constituida por dos dominios citoplasmáticos, de los

cuales uno corresponde al dominio catalítico, que es el dominio que presenta un ácido aspártico que se fosforila y un sitio de unión a ATP (Sepúlveda-Justo M., 2006).

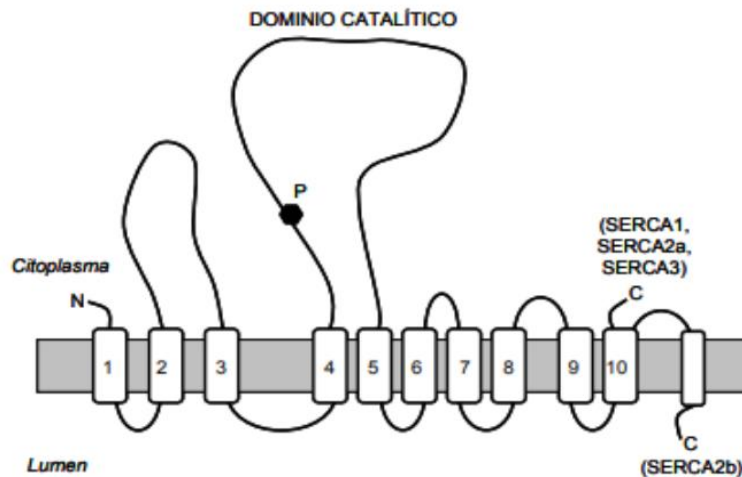


Figura 8. Estructura de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA). Cuenta con 10 dominios transmembranales. Los dominios 4 y 5 forman el dominio catalítico que se encuentra del lado del citoplasma. Cabe mencionar que dependiendo de la isoforma su extremo carboxilo terminal se encontrara en la región citoplásmica o del lumen de SERCA. *Modificado de Sepúlveda-Justo M., 2006.*

SERCA presenta 3 isoformas: SERCA1, SERCA2 y SERCA3, las cuales cuentan con ciertas variantes respectivamente. SERCA1 presenta dos variantes, SERCA3 cuenta con 5 variantes y SERCA2 con dos variantes (Figura 9). En el caso particular de SERCA2 cuenta con dos variantes: SERCA2a y SERCA2b cuya diferencia radica en que la variante SERCA2b posee una secuencia extra en el dominio C-terminal que da lugar a una secuencia transmembranal más. Dicha secuencia extra es de suma importancia puesto que se sugiere que éste dominio de SERCA2b podría ser el responsable de darle una mayor afinidad al Ca^{2+} , comparada con la variante SERCA2a (Sepúlveda-Justo M., 2006).

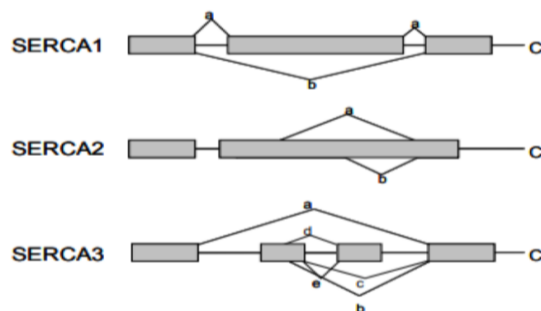


Figura 9. Isoformas y variantes de la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SERCA). La isoforma SERCA1 cuenta con dos variantes: SERCA1a y SERCA1b, la isoforma SERCA2 cuenta también con dos variantes: SERCA2a y SERCA2b, mientras que la isoforma SERCA3 cuenta con cinco variantes: SERCA3a, SERCA3b, SERCA3c, SERCA3d y SERCA3e. *Modificado de Sepúlveda-Justo M., 2006.*

Cada una de las isoformas y sus variantes se expresan en tejidos diferentes, particularmente la isoforma SERCA2 variante SERCA2b se expresa principalmente en el músculo liso incluyendo el MLVA y en tejido no muscular, por ejemplo, la piel (Reyes-Juárez J.L. y Zarain-Herzberg A., 2006).

La regulación de SERCA varía de acuerdo con cada isoforma, por ejemplo, en el caso de la isoforma SERCA2 variante SERCA2b, la regulación está dada por las proteínas calreticulina y calnexina, que son proteínas del RS y son inhibidores reversibles. Además de la calreticulina y la calnexina, otra proteína que inhibe irreversiblemente a SERCA es la Tapsigargina. Otro ejemplo de inhibidor es el vanadato, quien puede inhibir a SERCA en concentraciones mayores a 20µM (Sepúlveda-Justo M., 2006).

1.8. Respuesta alérgica en cobayos en un modelo de asma

El estudio del asma a lo largo del tiempo, ha empleado diferentes modelos animales que proporcionan información diferente dependiendo de las respuestas anatómicas y fisiológicas de cada especie. Particularmente, el modelo de asma en cobayo, resulta ser mayormente interesante, ya que presenta ciertas características que permiten la evaluación del asma alérgica, tales como los procesos fisiopatológicos de las vías aéreas similares a los que se presentan en los humanos que padecen asma, una respuesta de obstrucción relativamente sencilla frente a la exposición con alérgenos, una fácil manipulación durante la experimentación y la no presencia

de tolerancia inmunológica, siendo esta última, una de las características más valiosas, sobre todo, si se trabaja con un modelo de asma alérgica (Vivolo-Aun M. et al., 2017).

Al igual que en los humanos, el cobayo puede desarrollar respuestas tempranas y tardías cuando se expone a diversos alérgenos. De igual forma, la presencia de respuestas variables de broncoobstrucción que se observan en el humano, pueden ser observadas en el modelo de asma alérgica en cobayo en respuesta a la ovoalbúmina, tal como se observó en un estudio realizado por Ramos R. et al., en el año 2013. Dentro de dicho estudio (Ramos-Ramírez et al., 2013), se describió la respuesta obstructiva de un grupo de cobayos que no presentó respuesta en presencia del alérgeno, descritos como cobayos no respondedores, los cuales, presentaban un perfil inmunológico diferente a los cobayos que sí respondieron a todos los retos antigénicos llamados cobayos con modelo de asma. En un estudio posterior realizado por Guerrero-Clorio S. en 2018, se describió un grupo de cobayos diferente a los identificados anteriormente por Ramírez. Dicho grupo presentaba una respuesta variable en presencia del alérgeno, por lo que fueron incluidos en un grupo llamado cobayos con respuesta variable. En el mismo estudio (Guerrero-Clorio S., 2018) un análisis mostró la presencia o ausencia de hiperreactividad de las vías aéreas (HVA) de los tres grupos de cobayos: modelo de asma, respuesta variable y no respondedores, en dos modelos de asma alérgica, aguda con exposición a tres retos antigénicos durante 35 días y crónica, con exposición a doce retos antigénicos en un lapso de 140 días. En los cobayos con modelo de asma tanto aguda como crónica, hubo presencia de HVA, por lo que los cobayos fueron considerados hiperreactores. Por otro lado, los cobayos con respuesta variable presentaron diferencias dentro de los valores de HVA, ya que algunos fueron identificados como hiperreactores, sin embargo, estadísticamente los cobayos con respuesta variable, tanto del modelo de asma agudo y crónico, no presentaban HRVA. Finalmente, los cobayos no respondedores, tuvieron diferencias en la HVA dependientes del modelo, ya que los cobayos no respondedores del modelo de asma agudo fueron hiperreactores, mientras que, en el modelo de asma crónico, la HVA se perdió (Guerrero-Clorio S., 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

El asma es una de las afecciones pulmonares más importantes a nivel mundial. Diversos modelos experimentales han tratado de asemejar diversos aspectos fisiopatológicos que se presentan en el humano con asma, siendo el cobayo, uno de los animales con mayor utilidad dentro de los modelos de asma. Dentro del laboratorio, se ha planteado analizar diferentes características principales del asma, principalmente la hiperreactividad de las vías aéreas. Sin embargo, las vías de señalización o la participación de los principales componentes de la maquinaria contráctil del músculo liso de las vías aéreas dentro de la hiperreactividad en el asma, aún son desconocidos. De igual forma, hemos identificado dos grupos diferentes a los cobayos con modelo de asma, los cobayos que no presentan broncoobstrucción en respuesta al reto antigénico considerados cobayos no respondedores y los cobayos que presentan una respuesta bronco-obstructiva variable cuando se exponen al alérgeno. En dichos grupos, al igual que en los cobayos con modelo de asma, la identificación y comportamiento de la maquinaria contráctil dentro de la hiperreactividad de las vías aéreas, aún es controversial. Por todo lo anterior, el presente estudio, analizará la expresión y localización de las principales proteínas de la maquinaria contráctil en el músculo liso, como son MYPT1, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b, y su relación con la hiperreactividad de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores en el asma.

3. HIPÓTESIS

La expresión y localización de las principales proteínas involucradas en la contracción del músculo liso de las vías aéreas: MYPT1, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b, podría estar involucrada con el aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas en el asma.

4.OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar si la expresión y localización de algunas proteínas involucradas en el mecanismo de la contracción del músculo liso de las vías aéreas: MYPT1, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b, podría estar relacionada con el aumento de la hiperreactividad en cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores.

4.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la reactividad de las vías aéreas de cobayos correspondientes a los grupos con modelo de asma, con respuesta variable, no respondedores y cobayos control.

2. Determinar la expresión y localización de la proteína MYPT1 y sus formas fosforiladas en MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en musculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores mediante la técnica de inmunohistoquímica.

3. Determinar la expresión y localización de las isoformas ROCK1 y ROCK2 en musculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores mediante la técnica de inmunohistoquímica.

4. Determinar la expresión y localización de la ATPasa de Ca²⁺ (SERCA) en su isoforma 2 variante b (SERCA2b) en musculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores mediante la técnica de inmunohistoquímica.

5. Determinar la correlación entre el aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas y la expresión de las proteínas involucradas en la contracción del músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cobayos

Para los experimentos se utilizaron solamente cobayos machos cuyo peso oscilaba entre 350-400g pertenecientes a la cepa es HsdPoc: HD de Harlan México. Los cobayos se criaron en el bioterio de las instalaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” bajo condiciones controladas de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 50-70% de humedad, aire filtrado a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y camas esterilizadas. La alimentación fue a base de croquetas para cobayo (Harlan S.A de C.V.) y agua *ad libitum*. Es importante mencionar que los cobayos utilizados para este proyecto fueron manipulados de acuerdo a los lineamientos que marca la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y el proyecto fue aprobado por el Comité Científico y Ético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (B37-12DI./CCB344/12, 29 de noviembre 2021).

5.2. Pletismografía barométrica.

La pletismografía barométrica es el método más utilizado para la medición de la función pulmonar, ya que presenta como principal ventaja el hecho de poder realizar estudios prolongados o repetitivos sin que los animales sometidos a experimentación sufran. Además, el hecho de que los animales no tienen restricción de movimiento presenta una ventaja para evitar un nivel mínimo de estrés o ansiedad del animal y por lo tanto intentar obtener la desviación en el resultado del experimento. Sin embargo, el estrés o la ansiedad que se puede presentar durante el experimento en el animal, podría influir de alguna manera en el patrón respiratorio (Bazán-Perkins B. et al., 2004).

El equipo que se requiere para la pletismografía barométrica (Figura 10) consta de nebulizador, una bomba de extracción, una cámara de acrílico, un transductor conectado a un amplificador que a su vez está conectado a una computadora. La medición de la presión que existe dentro de la cámara es evaluada por medio de un transductor de presión diferencial. Durante la inspiración, el aire se humedece y se calienta en los pulmones y por ello el volumen de aire dentro del tórax es mayor con respecto al volumen de aire que el animal extrae en la cámara. Dicho aumento de

volumen dentro del tórax produce un aumento en la presión de la cámara de acrílico, la cual es comparada con el valor de presión estándar de 1 atmósfera en la cámara de referencia. Estos cambios de presión por el aumento de calor y vapor de agua al aire que es inhalado por los animales cuando ingresan a su aparato respiratorio son detectados por el transductor (Hamelmann E. et.al., 1997).

A través de la pletismografía barométrica es posible obtener el índice de broncoobstrucción (ÍB) de cada animal a través de la siguiente fórmula:

$$\text{ÍB} = ((T_e - R_t) / R_t) (PEP / PIP)$$

Donde:

- Te= Tiempo de espiración (s)
- Rt= Tiempo de relajación (s)
- PEP= Pico de presión espiratoria (cmH₂O)
- PIP= Pico de presión inspiratoria (cmH₂O)

(Bazán-Perkins B. et al., 2004).

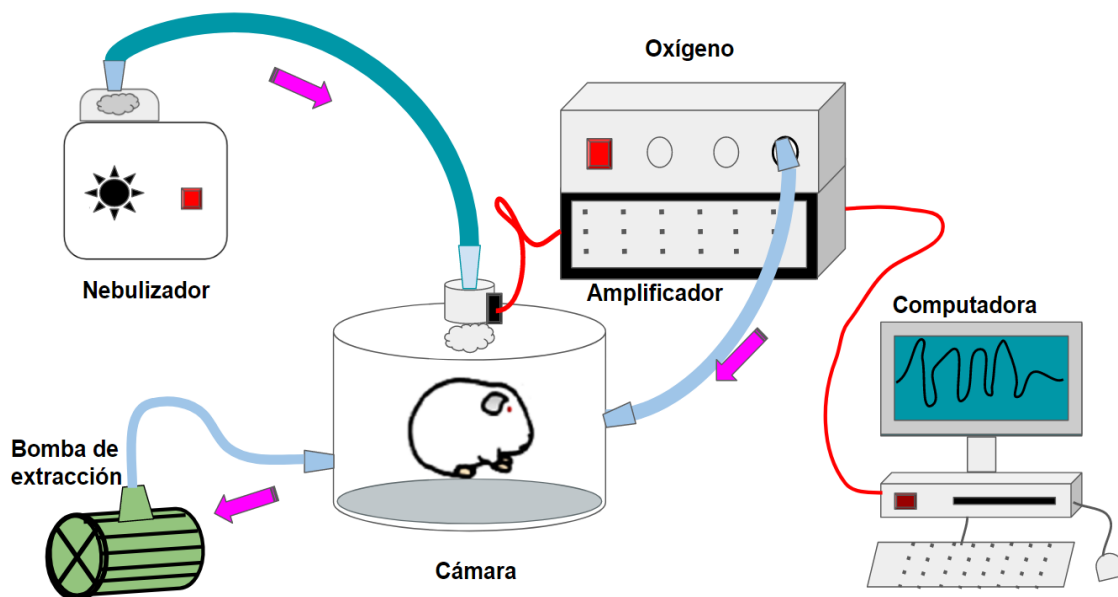


Figura 10. Pletismografía. En la figura se muestra como se llevó a cabo la pletismografía y el equipo se utilizó para ello. Se muestra que la cámara especial que contiene al cobayo está conectada a un nebulizador mediante el cual se suministró la OVA, así mismo la cámara se encuentra conectada por un transductor (cable de color rojo) a un amplificador que se conecta a una computadora para el procesamiento de la señal. Además, la cámara está conectada tanto a una fuente de oxígeno puesto que la cámara está sellada al vacío como a una bomba de extracción. Las flechas púrpuras indican la dirección del flujo.

5.3. Modelo agudo de asma alérgica

El modelo de asma alérgica se basó en un calendario que se muestra en la Figura 11, en la que se determina un periodo total de experimento de 36 días, teniendo como los días de trabajo experimental el día 1, día 8, día 15, día 25, día 35 y día 36. En el día 1 se realizó la sensibilización antigénica de un grupo de 8 cobayos por medio de una inyección intraperitoneal (i.p) e intradérmica de 0.5 mL cada una, las cuales contenían el antígeno de ovoalbúmina (OVA) (0.010 mg/mL, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio (1 mg/mL, J.T. Baker, NJ, EU), el cual fungió como adyuvante, disueltos en solución salina fisiológica (SSF). Los animales pertenecientes al grupo control fueron sensibilizados sólo con SSF.

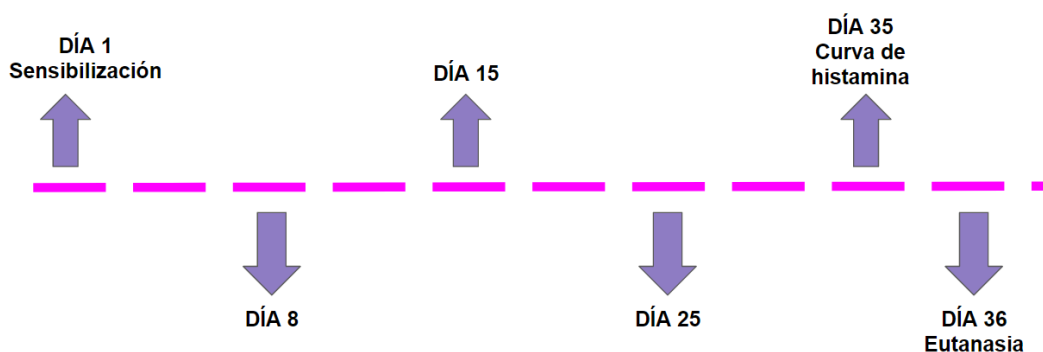


Figura 11. Calendario de sensibilización antigénica. Se muestran los días experimentales con los cobayos. Día 1: Sensibilización antigénica, día 8: Refuerzo antigénico. En los días 15 y 25 los cobayos fueron retados con ovoalbúmina. En el día 35 se evaluó la reactividad de una curva de dosis-respuesta y finalmente el día 36 en el que fueron eutanasiados.

En el día 8 se llevó a cabo el refuerzo de la sensibilización de 11 cobayos tal cual se muestra en la Figura 12. Se colocaron en una cámara de acrílico y se les administró OVA (0.06 mg/mL) disuelta en SSF en forma de aerosol por medio de un nebulizador (US-Bennet) cuyo flujo es de 2 mL/s durante 5 minutos. A los animales del grupo control, sólo se les reforzó con SSF durante el mismo periodo de tiempo.

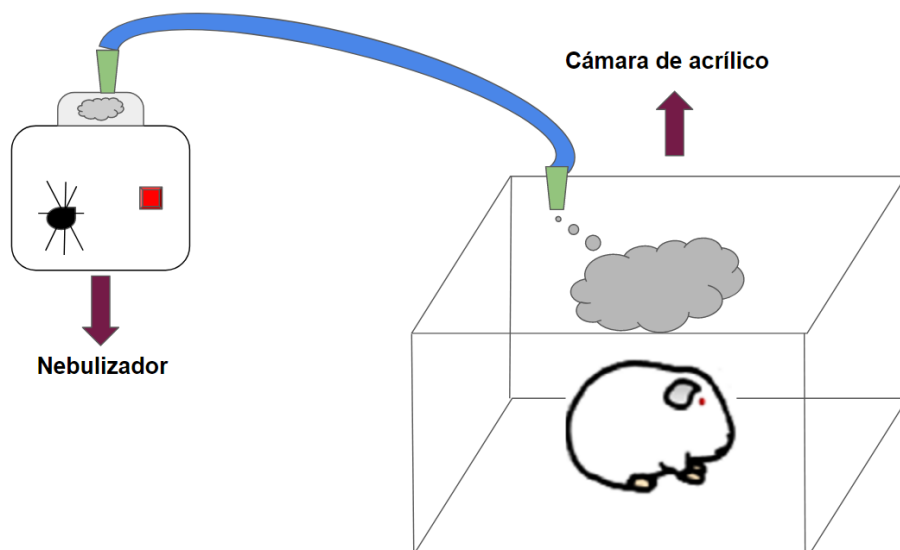


Figura 12. Día 8, refuerzo antigénico. Se llevó a cabo mediante una cámara de acrílico y la administración de OVA a los cobayos por medio del nebulizador US-Bennet.

En el día 15 se llevó a cabo el primer reto antigénico. Los cobayos se introdujeron en cámaras de acrílico especiales completamente selladas al vacío, conectadas a un amplificador y éste a su vez a un pletozógrafo barométrico para animales en movimiento, lo que permitió la medición del índice de bronco-obstrucción de los cobayos (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Debido a que las cámaras se encuentran selladas al vacío fue necesario contar con un flujo continuo de aire de 10 mL/s lo cual no tiene ninguna intervención o modificación en la señal respiratoria de los cobayos durante el experimento. Se comenzó con un registro del índice de bronco-obstrucción inicial o basal, posteriormente se les administró OVA disuelta en SSF, por un minuto, de forma nebulizada para los cobayos del modelo de asma y sólo con SSF para los animales controles. Finalizada la nebulización con OVA (reto antigénico) se tomó el registro pletozógráfico durante un tiempo aproximado de 20 minutos con el fin de obtener el valor de la respuesta máxima o máximo valor de bronco-obstrucción alcanzado después del reto. Para el día 25 se llevó a cabo el mismo procedimiento que el día 15 (Figura10).

En el día 35, primeramente, se tomaron los valores basales y posteriormente se dio paso a la evaluación de la reactividad de las vías aéreas mediante una curva de dosis-respuesta con histamina partiendo de una concentración de 0.013 mg/mL

hasta llegar a una concentración máxima de 0.32 mg/mL. Lo anterior fue realizado para ambos grupos experimentales. Cada concentración fue administrada durante un minuto obteniendo los índices de bronco-obstrucción (ÍB). La administración de las distintas concentraciones de histamina se detuvo cuando el ÍB del cobayo triplicó su valor basal. Seguidamente se le practicó un reto con OVA y tres horas después se le realizó una segunda curva, de modo idéntico a la curva anterior.

Las muestras fueron tomadas 24 horas después de evaluar la reactividad de las vías aéreas (día 36) , los animales fueron sobredosificados con pentobarbital sódico (28 mg/kg) vía í.p. Se obtuvieron ambos pulmones, los cuales fueron correctamente almacenados por separado en formalina al 10% y perfectamente rotulados. El procedimiento del día 36 antes mencionado, se realizó tanto en los cobayos del modelo de asma como en los cobayos controles.

5.4. Inmunohistoquímica

Para la realización de la técnica de inmunohistoquímica, los pulmones fueron incluidos en bloques de parafina con el fin de obtener cortes histológicos con un grosor de 3µm. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos silanizados (laminillas silinizadas) para poder realizar posteriormente la técnica de inmunohistoquímica.

Las laminillas se desparafinaron en un horno de hibridación durante 30 minutos. Seguidamente, cada laminilla se sometió a hidratación en xilol durante 10 minutos, después en xilol-etanol durante 5 minutos, posteriormente en etanol al 90% por 5 minutos, luego en etanol al 100% durante 5 minutos y finalmente en agua miliQ durante 5 minutos. Una vez hidratadas las laminillas, se lavaron en una solución de PBS 1x en agitación durante 5 minutos. La solución de PBS se preparó con 1.558g de bifosfato de sodio, 12.45g de fosfato sódico y 8.766g de cloruro de sodio aforado a un litro de agua desionizada quedando como una solución 10x de la cual se tomaron 10 mL para aforarlos con 90mL de agua desionizada para tener la solución de PBS 1x. Para la recuperación antigénica se preparó un buffer de citratos 1x, que se preparó con 1.29 g de citrato en 500 mL de agua desionizada, con el cual las laminillas fueron calentadas durante 1.30 minutos en horno de microondas y posteriormente se dejaron enfriar por un lapso de 20 minutos para después lavarse

con solución de PBS 1x durante 5 minutos en agitación. Transcurrido este tiempo se delimitó el tejido con un marcador de cera y se realizó el bloqueo con peroxidasa endógena del Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector Laboratorios, USA), durante 15 minutos, para después hacer un lavado con solución de PBS 1x durante 5 minutos en agitación. Posteriormente se hizo un bloqueo de sitios inespecíficos cubriendo el tejido con suero de bloqueo al 0.3% e incubando durante 30 minutos. Al terminar el lapso de tiempo anterior, se realizó un lavado con solución de PBS 1x durante 5 minutos en agitación.

Las diluciones de los anticuerpos a utilizar fueron preparadas de acuerdo a lo que marcaban los insertos de los anticuerpos MYPT1, MYPT1-Thr696, MYPT1-Thr850 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) ROCK1 (MyBioSource, California, USA), ROCK2 (Abcam, Cambridge, UK) y SERCA2b (Abcam, Cambridge, UK). De tal forma que la concentración de todos los anticuerpos fue de 1:25:

- 1 μ L de MYPT1 + 12.5 μ L de suero de bloqueo al 0.3% + 12.5 μ L de glicerol
- 1 μ L de MYPT1-Thr696 + 25 μ L de suero de suero de bloqueo al 0.3%
- 1 μ L de MYPT1-Thr850 + 25 μ L de suero de bloqueo al 0.3%
- 1 μ L de ROCK1 +12.5 μ L de suero de bloqueo al 0.3% + 12.5 μ L de glicerol
- 1 μ L de ROCK2 + 12.5 μ L de suero de bloqueo al 0.3% + 12.5 μ L de glicerol
- 1 μ L de SERCA2b + 12.5 μ L de suero de bloqueo al 0.3% + 12.5 μ L de glicerol

Cada dilución de Ac fue colocada sobre una laminilla, por separado, y fueron incubadas en una cámara húmeda a -4°C durante toda la noche. Al siguiente día las laminillas se reposaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para después proceder a lavarlas 2 veces en solución de PBS 1x en agitación durante 5 minutos. Posteriormente las laminillas fueron incubadas en oscuridad durante 3 horas con el anticuerpo secundario perteneciente al Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector Laboratorios, USA). Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario, se procedió al lavado durante 5 minutos con solución de PBS 1x en agitación. Para la tinción se utilizó una solución de diaminobencidina, que se preparó una pastilla de diaminobencidina (BioRad, USA) de 0.5 μ g en 20 mL de

solución de PBS1x y 40µL de peróxido, la cual se resguardo de la luz. Una vez preparada la diaminobencidina se colocó sobre el tejido cubriendolo y se dejó actuar por un lapso de 1 hora para después lavar con agua miliQ y contrateñir con hematoxilina de Mayer por 15 segundos. Nuevamente se lavó con agua miliQ. Finalmente se secaron las laminillas y se procedió al montaje para su observación en el microscopio, mediante la colocación de una gota de resina y de un cubreobjetos. Se dejaron secar y para finalmente ser analizadas al microscopio Carl Zeiss. Las laminillas blanco fueron sometidas al mismo procedimiento a excepción de la incubación con el anticuerpo primario.

5.5. Análisis de expresión digital por píxeles en el programa ImageJ-Fiji

El análisis de expresión de proteínas se realizó a partir de la obtención de las fotografías a un aumento de 100x observadas en las laminillas bajo el microscopio Carl Zeiss. Seguidamente se recurrió al programa ImageJ-Fiji para el análisis de expresión mediante la evaluación total de píxeles que presentaban marca positiva para las proteínas a analizar. Se tomaron 5 cuadrantes al azar dentro de las imágenes de músculo liso de las vías aéreas de n=4 cobayos por grupo, y se sometieron un análisis directo en el programa *Color Dencovolution*, en donde se obtiene una separación de píxeles correspondientes al color de marca obtenido por la técnica de diaminobencidina. Una vez obtenidos dichos pixeles, se revirtió el color de marca a pixeles de longitud correspondientes al color blanco, mientras que el fondo fue revertido a color negro. Finalmente, mediante un histograma se obtuvo el número de píxeles en color blanco (correspondiente a la marca positiva) y se comparó con respecto al número de píxeles totales analizados.

5.6. Análisis estadístico

Para evaluar la reactividad de las vías aéreas de cobayos control y con modelo de asma, se realizó una curva de respuesta a la histamina de las vías aéreas a través de la exposición a soluciones crecientes en concentración de histamina. El valor de la dosis provocativa 200% (PD₂₀₀), se obtuvo por medio de la diferencia del valor PD₂₀₀ después del reto antigénico con ovoalbúmina entre el valor PD₂₀₀ antes del reto antigénico, cifra correspondiente al valor de reactividad de las vías aéreas. Para

determinar la diferencia del valor de la reactividad de las vías aéreas se realizó una prueba de varianza *ANOVA* de una vía, seguida de una prueba de *Dunnnett*, ambas con significancia estadística asignada de $P < 0.05$. De igual forma, la diferencia de expresión para cada proteína analizada fue realizada por un análisis de *ANOVA* de una vía seguida de una prueba de *Dunnnett*, cuya significancia asignada para ambas pruebas fue de $P < 0.05$. Finalmente, se realizó una correlación de Person entre los valores de expresión obtenidos a partir del programa digital *ImageJ-Fiji* y los valores de la reactividad de las vías aéreas. Los datos que se presentan en el texto están expresados como media \pm error estándar y fueron obtenidos en el programa *GraphPad Prism*.

6. RESULTADOS

6.1 Reactividad de las vías aéreas en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Se evaluó la reactividad de las vías aéreas por medio de la administración de dosis crecientes de histamina antes y después del reto antigénico con OVA. Mediante el análisis de los valores del promedio de la dosis provocativa 200% (PD₂₀₀) en cobayos pertenecientes al grupo de modelo de asma, respuesta variable y no respondedores, se observó una disminución de la dosis PD₂₀₀ después del reto antigénico en todos los grupos experimentales comparados con los cobayos del grupo control. Por lo que se concluye que los cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores son hiperreactores (Figura 13).

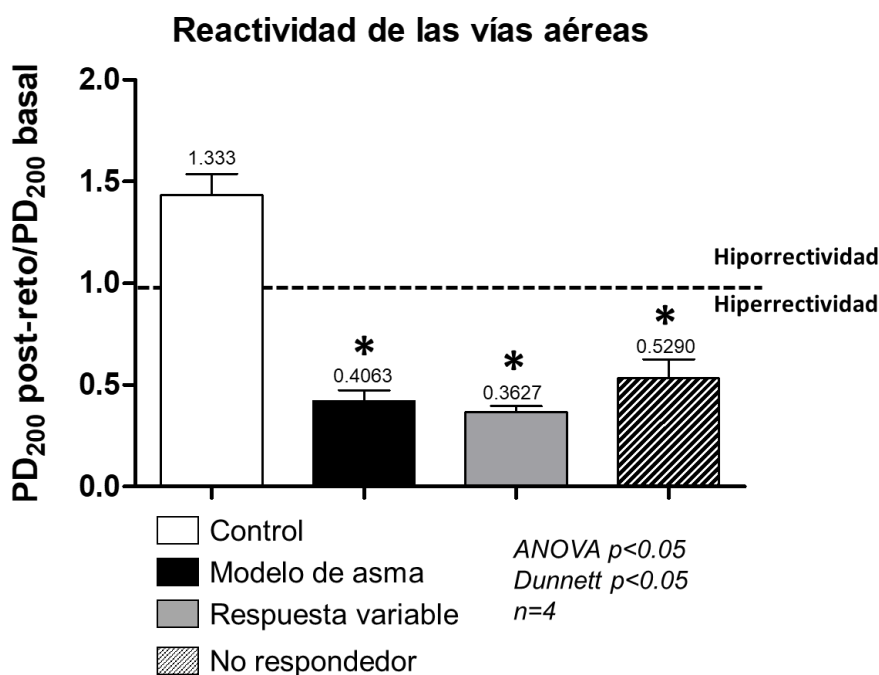


Figura 13. Reactividad de las vías aéreas inducida por el reto antigénico con OVA en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. Se observa el cociente del valor de la PD₂₀₀ en respuesta a la histamina antes del reto antigénico, sobre el valor de la PD₂₀₀ en respuesta a la histamina después del reto antigénico. La línea discontinua representa al límite entre los valores correspondientes a la hiperreactividad e hiporreactividad. Las barras corresponden al análisis del promedio \pm del error estándar de $n=4$ cobayos control representado con la barra blanca, $n=4$ cobayos con modelo de asma representados en la barra negra, $n=4$ cobayos con respuesta variable representados con la barra gris y $n=4$ cobayos no respondedores representados con la barra diagonal. Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y prueba de Dunnett $p < 0.05$

6.2 Localización y expresión de MYPT1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón de cobayo, se evaluó la localización de MYPT1 en el músculo liso pulmonar de cobayos control, con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores. Como se puede apreciar en la Figura 14a, los cobayos de todos los grupos analizados presentaron una localización de MYPT1 en el músculo liso traqueal, identificada con un asterisco en color azul. Un análisis digital en el programa ImageJ-Fiji interpretó la expresión de MYPT1 de acuerdo a la presencia de pixeles correspondientes a la marca positiva de la proteína. Como se muestra en la Figura 14b, la expresión de MYPT1 no presentó diferencias significativas en ningún grupo experimental con respecto a los cobayos control ($p < 0.05$).

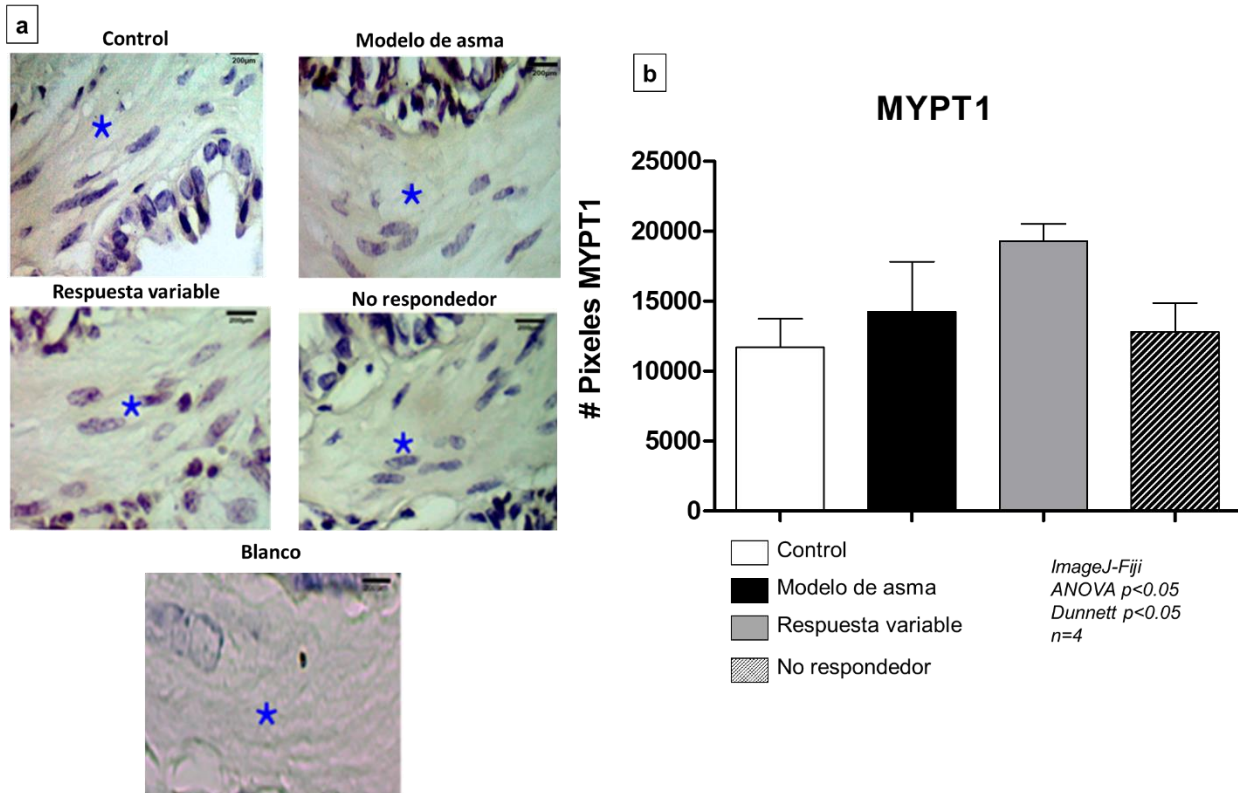


Figura 14. Expresión y localización de MYPT1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de MYPT1 en músculo liso traqueal de todos los grupos de cobayos analizados identificada con un asterisco en azul. b) Análisis de expresión de MYPT1 en cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores. No se observan diferencias significativas de expresión en los grupos experimentales con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnett $p < 0.05$; $n = 4$*

6.3 Expresión y localización de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón, se observó la localización de la forma fosforilada MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos control, con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores. Como se puede apreciar en la Figura 15, todos los grupos de cobayos presentaron una localización positiva en el músculo liso de las vías aéreas identificado con un asterisco en color azul (Figura 15a). Se realizó un análisis digital en el cual se evaluó la expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ de acuerdo a la presencia de los pixeles pertenecientes a la marca positiva observada en el músculo liso de las vías aéreas. En dicho análisis sólo se observó una disminución significativa de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en el grupo de cobayos no respondedores comparado con el grupo control ($p < 0.05$), mientras que los grupos con modelo de asma y con respuesta variable no presentaron diferencias significativas (Figura 15b).

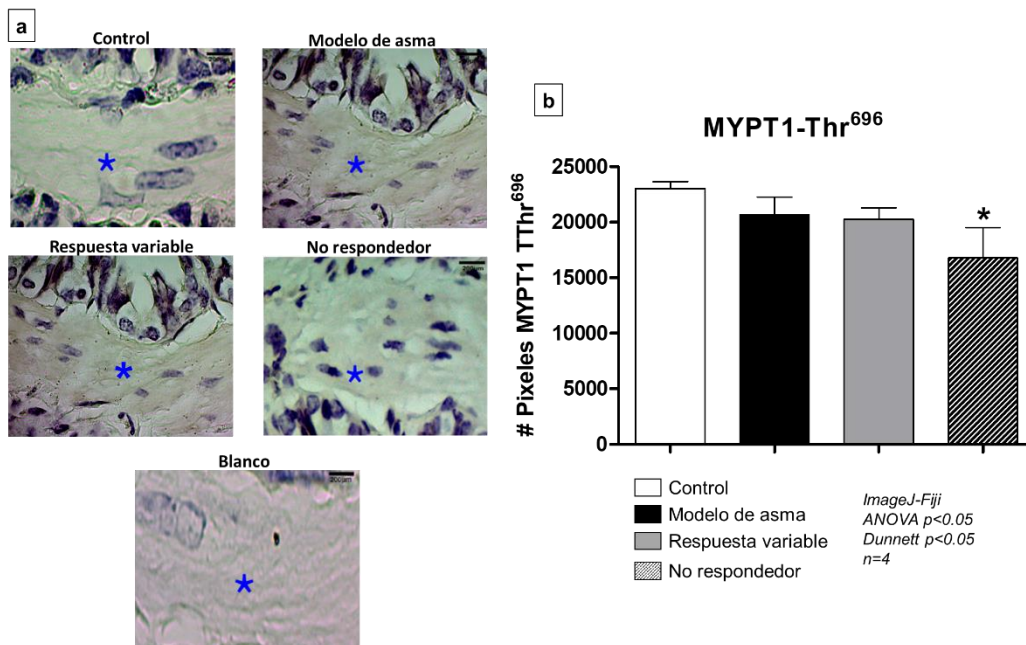


Figura 15. Expresión y localización de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en el músculo liso de las vías aéreas de todos los grupos analizados identificado con un asterisco en color azul. b) Análisis de expresión de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ en cobayos con modelo de asma, con respuesta variable y no respondedores. No se observan diferencias significativas de expresión en los grupos experimentales con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnett $p < 0.05$; $n=4$*

6.4 Expresión y localización de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón, se observó la localización de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos pertenecientes al grupo control, modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. La localización positiva de la forma fosforilada MYPT1-Thr⁸⁵⁰ (Figura 16) presentó una marca positiva en el músculo liso de las vías aéreas de todos los grupos analizados, identificado con un asterisco en color azul (Figura 16a). Posteriormente, un análisis digital a través de la cuantificación de pixeles de la marca positiva para MYPT1-Thr⁸⁵⁰, no identificó diferencias significativas en ninguno de los tres grupos experimentales en comparación con la expresión presente en el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 16b).

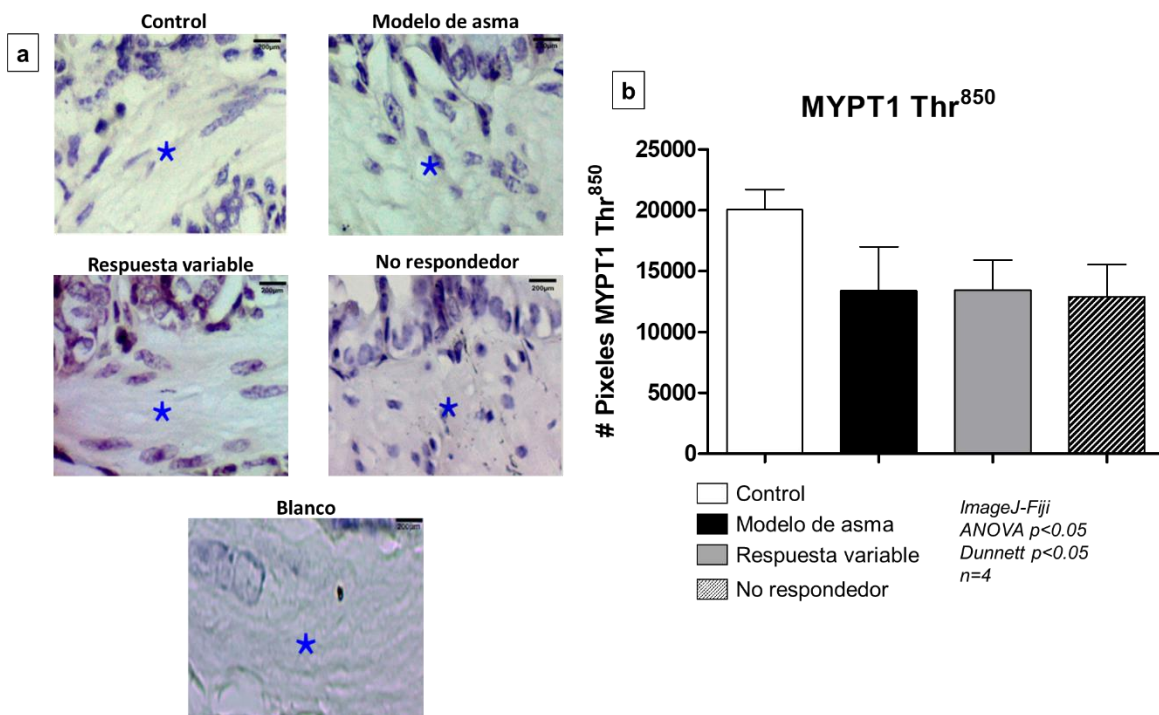


Figura 16. Expresión y localización de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en el músculo liso de las vías aéreas identificado con un asterisco en color azul. b) Análisis de expresión de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. No se observan diferencias significativas de expresión en los grupos experimentales con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnett $p < 0.05$; $n = 4$*

6.5 Expresión y localización de ROCK1 en músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón, se identificó la localización de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos control, con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. Como se puede apreciar en la Figura 17, la localización en el músculo liso de las vías aéreas fue positiva para la isoforma de ROCK1, tal como lo muestra el asterisco en color azul (Figura 17a). A partir de un análisis digital por píxeles, se evaluó la expresión de ROCK1 en las imágenes obtenidas de la marca positiva para ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas. Tal como se muestra en la Figura 17b, no hubo diferencias significativas para ningún grupo experimental con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

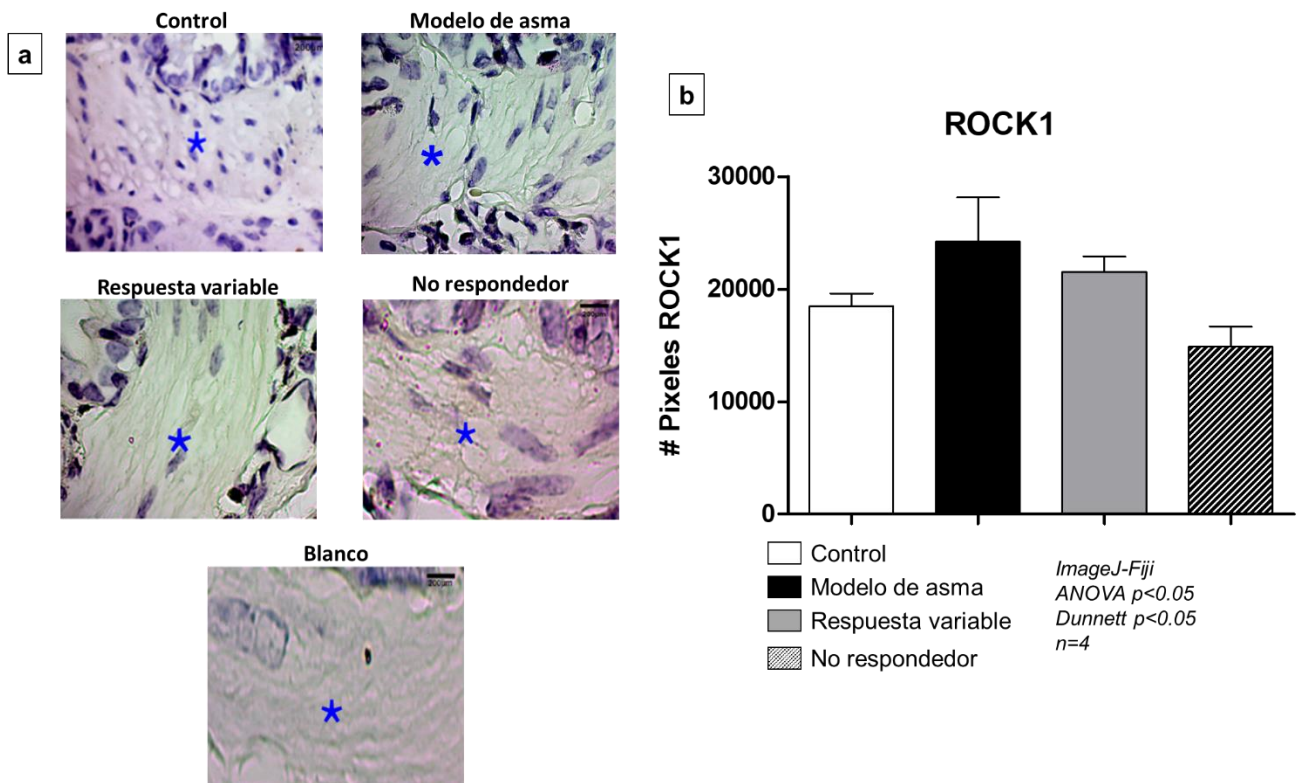


Figura 17. Expresión y localización de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas identificado con un asterisco en color azul. b) Análisis de expresión de ROCK1 en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. No se observan diferencias significativas de expresión de los grupos experimentales con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnett $p < 0.05$; $n=4$*

6.6 Expresión y localización de ROCK2 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Mediante la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón, se observó la localización de ROCK2 en el músculo liso de las vías aéreas. La isoforma ROCK2 presentó una localización positiva en todos los grupos analizados (Figura 18), identificado con un asterisco en color azul (Figura 18a). Se llevó a cabo un análisis digital en el cual se evaluó la expresión de ROCK2 con base a la presencia y cuantificación de los pixeles correspondientes a la marca positiva en el músculo liso de las vías aéreas. Dicho análisis mostró un aumento de expresión significativa en el grupo de cobayos del modelo de asma, respuesta variable y no respondedores comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 18b).

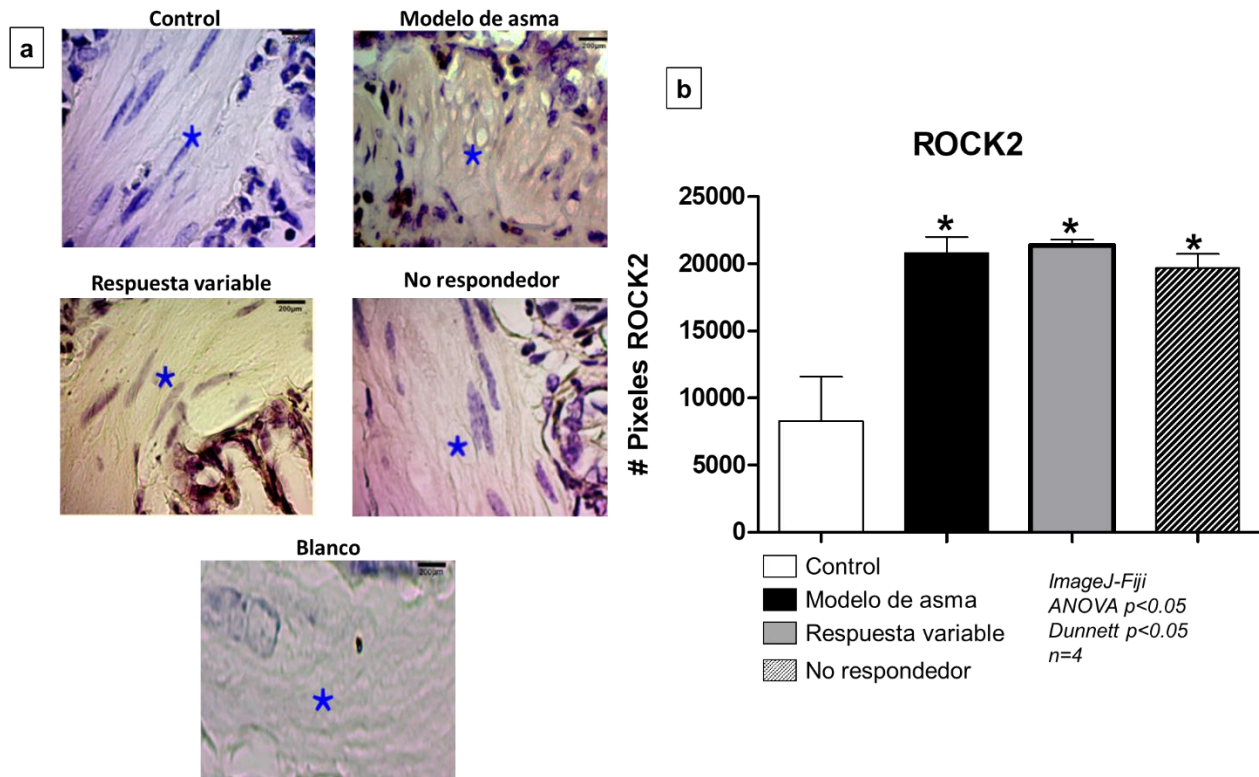


Figura 18. Expresión y localización de ROCK2 en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas identificado con un asterisco en color azul. b) Análisis de expresión de ROCK1 en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. Se observan diferencias significativas de expresión en los grupos de modelo de asma, respuesta variable y no respondedores con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnnett $p < 0.05$; $n = 4$*

6.7 Expresión y localización de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

A través la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de pulmón, se identificó la localización de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos control, con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. Se muestra con un asterisco en color azul, la localización positiva de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de todos los grupos experimentales, incluyendo el grupo control (Figura 19a). Mediante un análisis digital se evaluó la expresión de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de acuerdo a la cantidad de pixeles correspondientes a la marca positiva de la proteína SERCA2b en imágenes resultantes de las pruebas de inmunohistoquímica. El análisis mostró un aumento significativo de SERCA2b en cobayos de los grupos respuesta variable y no respondedores comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 19b).

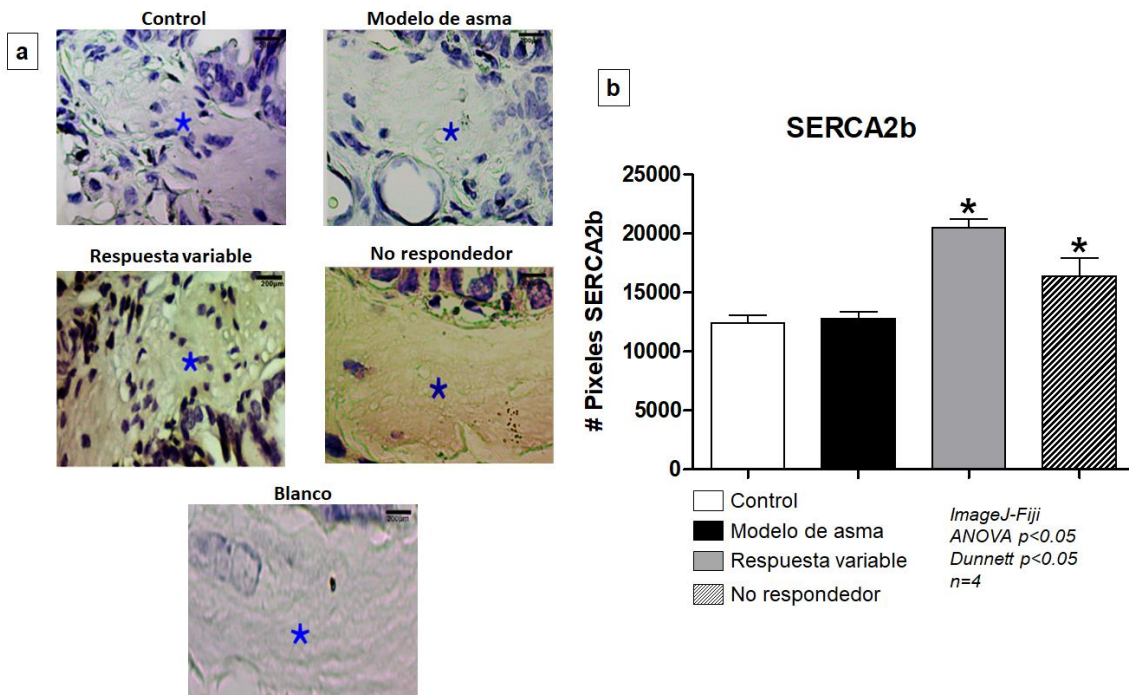


Figura 19. Expresión y localización de SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. a) Localización positiva de ROCK1 en el músculo liso de las vías aéreas identificado con un asterisco en color azul. b) Análisis de expresión de ROCK1 en cobayos con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores. Se observan diferencias significativas de expresión en los grupos de respuesta variable y no respondedores con respecto al grupo control. *Diferencias significativas: prueba de ANOVA $p < 0.05$ y Dunnett $p < 0.05$; $n = 4$*

6.8 Correlación entre la reactividad y la expresión de las proteínas MYPT1, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b en músculo liso de las vías aéreas de cobayos control, con modelo de asma, respuesta variable y no respondedores.

Se llevó a cabo una correlación entre los valores de la reactividad de las vías aéreas y la expresión de las proteínas MYPT1, las formas fosforiladas MYPT1-Thr⁶⁹⁶, MYPT1-Thr⁸⁵⁰, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b en el músculo liso de las vías aéreas de todos los grupos experimentales, incluyendo el grupo control (Figura 20). En la tabla que se muestra en la Figura 20, se presentan los valores de r obtenidos de la correlación de Pearson realizada para cada proteína analizada. De igual forma se muestra el valor de probabilidad de cada prueba ($p < 0.05$) (Figura 20a). Solamente la expresión de la proteína ROCK2 correlacionó significativamente con el valor de hiperreactividad de las vías aéreas presente en los grupos de cobayos ($p < 0.0003$) (Figura 20b).

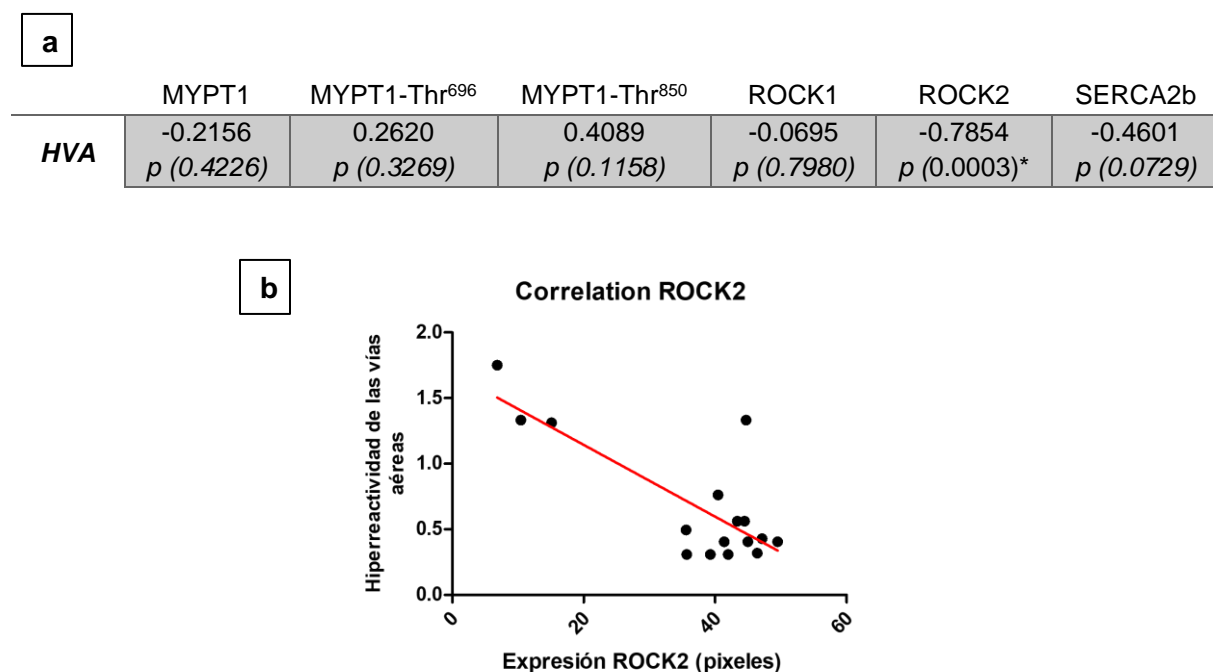


Figura 20. Correlación entre la expresión de MYPT1, MYPT1-Thr⁶⁹⁶, MYPT1-Thr⁸⁵⁰, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b y la hiperreactividad de las vías aéreas (HVA). a) Tabla que muestra los valores negativos corresponden a una correlación negativa, mientras que los signos positivos corresponden a una correlación positiva. b) Gráfica correspondiente a la correlación entre la expresión de la proteína ROCK2 y la hiperreactividad de las vías aéreas. Correlación negativa $p=0.0003$. Prueba de correlación de Pearson $p < 0.05$, $n = 16$ cobayos para cada proteína.

7. DISCUSIÓN

La hiperreactividad de las vías aéreas (HVA) se define como una broncoconstricción o estrechamiento excesivo del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) en respuesta a casi cualquier estímulo contráctil, siendo una de las características más importantes en diversas enfermedades pulmonares, incluyendo el asma. (Borak J. y Lefkowitz RY, 2016). En estudios anteriores a partir de un modelo de asma alérgica en cobayo, fue reportado un grupo experimental clasificado como cobayos con modelo de asma (MA), los cuales muestran obstrucción de las vías aéreas siempre que se someten a retos antigénicos en presencia de alérgenos como la ovoalbúmina, además de que presentan HVA, razón por la que han sido considerados cobayos hiperreactores (Álvarez-Santos M. et al., 2015) (Bazán-Perkins B. et al., 2009). Sin embargo, muy poca es la información que se tiene acerca de otros grupos que no presentan respuesta bronco-obstructiva en presencia del alérgeno, identificados como cobayos no respondedores (NR) y de aquellos cobayos con respuesta variable (RV), en los que se observa una variabilidad en la respuesta obstructiva, es decir, pueden tener o no aumentos en el \dot{V}_B . Por lo anterior, en nuestro análisis de reactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica aguda, se evaluaron los grupos de cobayos MA, NR y RV. Los resultados de dicho análisis mostraron valores de reactividad menores a 1, para los tres grupos experimentales y mayores a 1 para los cobayos control. Lo anterior sugiere que, tanto los cobayos MA, NR y RV son hiperreactores, independientemente de la respuesta obstructiva que se de en presencia del alérgeno, mientras que, un estudio previo, en donde se evaluó la reactividad de las vías aéreas de cobayos RV, no identificó HVA en éste grupo experimental, cuando se evaluaron en un modelo de asma alérgica agudo, mientras que, los cobayos NR si fueron hiperreactores (Guerrero-Clorio S., 2018). A diferencia del análisis realizado por Guerrero-Clorio, nuestro estudio identifica la presencia de HVA en cobayos RV. Lo anterior no necesariamente sugiere una incongruencia entre ambos estudios, puesto que, el grupo de cobayos RV, al presentar una variación en la respuesta obstructiva, que no es experimentalmente controlable, pueden responder en un sólo experimento y presentar valores de reactividad de las vías aéreas menores a 1, siendo clasificados

como cobayos hiperreactores. De esa forma, el papel de la hiperreactividad de las vías aéreas en cobayos RV podría estar siendo versátil, en donde una causa probable, sería la presencia de una actividad de la maquinaria contráctil similar a la observada en el grupo de cobayos RV. Un punto importante a considerar, es que, usualmente los cobayos que presentan respuesta variable no son reportados en estudios de asma alérgica a pesar de ser frecuentes, ya que, al no presentar respuesta a todos los retos antigénicos, son descartados de los experimentos o bien, las dosis de alérgeno son ajustadas para lograr obtener una respuesta (Guerrero-Clorio S., 2018). A pesar de lo anterior, es importante incluir a los cobayos RV en el estudio del asma, y de esa forma, intentar dilucidar las causas de su variabilidad en la respuesta bronco-obstructiva, ya que, dicha versatilidad también persiste en los pacientes con asma. Por otro lado, los resultados obtenidos en el grupo de cobayos NR coinciden con los obtenidos en el estudio de Guerrero-Clorio, en donde este grupo de cobayos presentó HVA en el modelo de asma alérgica agudo (Guerrero-Clorio S., 2018). Sin embargo, la presencia o ausencia de la HVA en ciertos grupos sigue siendo confusa.

Es claro que la HVA persiste independientemente de la respuesta bronco-obstructiva que se presente, lo que podría estar relacionado con la similitud de expresión y activación de la maquinaria de contracción del MLVA.

Muchas son las proteínas relacionadas con la contracción del músculo liso, siendo la subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina 1 (MYPT1) y la proteína cinasa asociada a Rho en sus dos isoformas: ROCK1 y ROCK2, algunas de las más importantes, relacionadas con el aumento de la HVA en el asma (Alvarez-González M., 2019).

En investigaciones anteriores, se ha observado que MYPT1 presenta cambios de expresión en el músculo liso traqueal de cobayos MA (Álvarez-Santos M., 2015) (Álvarez-González M., 2019). Por lo anterior, evaluamos la expresión y localización de MYPT1 en el músculo liso pulmonar, no sólo en cobayos MA, sino también en cobayos NR y RV, con el objetivo de dilucidar y comparar su expresión en todos los grupos. Nuestros resultados mostraron que MYPT1 se localizó en el MLVA de todos

los grupos experimentales, en donde no se identificaron cambios significativos en la expresión de MYPT1 de cobayos MA, RV y NR con respecto al grupo control. La subunidad reguladora de la fosfatasa MYPT1, ha sido ampliamente relacionada con el aumento de la contracción del músculo liso, sin embargo, tanto en los estudios de Alvarez-González en 2019, como en el presente, la relación de MYPT1 con el aumento de la HVA no ha sido significativa. Por otro lado, las formas fosforiladas de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰ han sido adjudicadas a la regulación negativa de la subunidad reguladora y, por lo tanto, a una inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (Jia X. et al., 2016; Chen C.P. et al. 2015). Debido a lo anterior, las formas fosforiladas de MYPT1 también fueron evaluadas en todos los grupos experimentales. Tanto la localización de MYPT1-Thr⁶⁹⁶, como de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ fueron observadas en el MLVA de todos los grupos analizados, incluyendo el grupo control. A pesar de lo anterior, la expresión de MYPT1-Thr⁸⁵⁰ no mostró diferencias significativas para ningún grupo de cobayos, a diferencia de la forma fosforilada MYPT1-Thr⁶⁹⁶, en donde los cobayos NR disminuyeron significativamente la expresión de la proteína con respecto a los cobayos del grupo control. Los resultados anteriores podrían sugerir que la HVA no depende de la inhibición de la proteína MYPT1, ya que sus formas fosforiladas no aumentan en los tres grupos de cobayos hiperreactores. Sin embargo, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ podría estar relacionada, de alguna forma, con la respuesta obstructiva, ya que sólo disminuye en cobayos NR. Como se mencionó anteriormente, la presencia de las formas fosforiladas MYPT1-Thr⁸⁵⁰ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰ inhiben la relajación del músculo liso por inhibición directa de la MLCP (Chen, C. P. et. al, 2015), y al no presentar diferencias entre los cobayos hiperreactores y los cobayos control, puede ser que no presenten un papel importante en la contracción sostenida del MLVA en el asma. Lo anterior no significa que la MLCP pueda encontrarse activa en el músculo liso de las vías aéreas cuando no aumenta la expresión de las formas fosforiladas MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰, puesto que, algunos inhibidores endógenos específicos de la subunidad catalítica PP1c, tales como CPI-17 o PHI-1, podrían estar regulando la actividad de MLCP (Peti W. et al., 2013; Pagiatakis C. et al., 2012).

Una de las vías de activación de dichos inhibidores es dada por la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK), considerada como una de las principales cinasas implicadas en el desarrollo de la HVA y en la inhibición de la relajación muscular (Julian L. y Olson M., 2014). Por lo anterior, las proteínas ROCK1 y ROCK2 también fueron evaluadas en el MLVA, siendo localizadas en dichas estructuras de todos los grupos experimentales. En cuanto a la expresión de ROCK1 en el MLVA, no se observaron cambios significativos en ningún grupo experimental comparado con el grupo control, mientras que la isoforma ROCK2, aumentó significativamente su expresión en el grupo de cobayos con HVA. En la literatura se habla de la presencia de ambas isoformas en el MLVA, siendo la isoforma ROCK1 la que se expresa en mayor medida (Julian L. y Oslon M.,2014), con lo que se esperaría que fuera ésta, la isoforma mayormente relacionada con la contracción excesiva del MLVA. Sin embargo, al no encontrar diferencias significativas de la expresión de ROCK1 en nuestro estudio, podría ser descartada como un regulador importante de la HVA en el asma. A pesar de lo anterior, nuestros resultados obtenidos para la isoforma ROCK2, coinciden con lo establecido en la literatura, en donde se le ha involucrado tanto en la regulación de la contracción del músculo liso (Zhu M. et al. 2011) como en el desarrollo de la HVA (Lambert J. y Weifeng S.,2015). Así, al aumentar significativamente la expresión de ROCK2 en cobayos hiperreactores, se considera a dicha proteína como un regulador importante de la HVA en el asma.

Mucho se ha hablado de que ROCK2 regula negativamente a MYPT1 por medio de dos fosforilaciones en treonina 850 y 696. Nuestros datos confirman el aumento de la isoforma ROCK2 en el asma, pero no de las formas fosforiladas MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰, lo que descarta que ROCK2 aumente para fosforilar a MYPT1 en el desarrollo de la HVA. Sin embargo, Pagiatakis y colaboradores en 2012, reportaron que los inhibidores CPI-17 y PHI-1 son activados por fosforilaciones dadas por diversas cinasas, una de las principales, la cinasa de ROCK, lo que podría estar explicando el aumento de expresión de ROCK2 en el asma, no solo involucrado en el aumento de la HVA, sino posiblemente presentando un papel importante en la regulación de la subunidad catalítica de la MLCP.

Otro aspecto importante es que los inhibidores CPI-17 y PHI-1 a su vez, están involucrados en una cascada de sensibilidad al Ca^{2+} , mecanismo importante para la activación de ROCK, lo que sugeriría algunas otras funciones de ROCK2 en el desarrollo de la HVA en el asma (Pagiatakis C. et al., 2012).

La expresión de la bomba de Ca^{2+} SERCA2b también fue evaluada en el MLVA. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de SERCA2b en cobayos con RV y NR. La bomba de Ca^{2+} SERCA2b se ha relacionado con la recapturación del Ca^{2+} intracelular en el retículo sarcoplásmico, promoviendo la disminución de la contracción y por tanto la relajación muscular (Reyes-Juárez J.L. y Zarain-Herzberg A., 2006). Sin embargo, se ha observado que la disminución de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular no necesariamente resultan en la activación del mecanismo de relajación muscular, ya que se llega a presentar un mecanismo de sensibilización de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} (Flores-Peredo L. et al., 2013; SS Ann., 2007). Por lo anterior, el incremento en la expresión de la bomba de Ca^{2+} SERCA2b en cobayos con RV y NR podría estar sugiriendo que no presenta relación con el desarrollo de las HVA, ya que no está aumentada en los cobayos MA, pero probablemente esté relacionada con la respuesta bronco-obstructiva, en donde sea necesaria para la disminución de la respuesta al alérgeno. Diversos estudios han reportado que SERCA2b disminuye su expresión en pacientes con asma cuando contrastan sus resultados con pacientes sanos (Mahn K. et al., 2009; Prakash Y.R., et al., 2009), incluso se ha sugerido que la reducción de su expresión podría tener un origen genético (Mahn K., et al., 2010). Lo anterior, podría explicar que los cobayos MA no presentaran cambios de expresión significativos.

Seguidamente se realizó una correlación entre los valores de la reactividad de las vías aéreas y la expresión de las proteínas analizadas, con la finalidad de analizar la relación directa entre ambas variables. En dicho análisis, se pudo observar una relación directa entre la HVA y la expresión de la proteína ROCK2. Esta relación fue estadísticamente significativa y presentó un valor de correlación negativo, es decir, cuando aumenta la expresión de ROCK2, la hiperreactividad también se eleva y viceversa, entre menor sea el valor de la hiperreactividad, menor es la expresión de

ROCK2. Lo anterior recalca nuevamente a la proteína ROCK2 como uno de los principales reguladores de la hiperreactividad de las vías aéreas en el asma alérgica, independientemente de la respuesta bronco-obstructiva que se presente.

Finalmente, uno de los aspectos que la presente tesis permite analizar, es el comportamiento de la maquinaria contráctil de los cobayos RV y cobayos NR. Se pensaría que los cobayos NR tuvieran un comportamiento de las principales proteínas involucradas en la contracción, si bien no idéntico, parecido a lo que se presenta en los cobayos del grupo control, debido a la falta de respuesta cuando son expuestos al alérgeno. Sin embargo, el comportamiento de dichas proteínas, específicamente de MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y SERCA2b, nos habla de un establecimiento de la maquinaria contráctil diferente, lo que implica ahondar en estudios futuros para lograr entender lo que sucede en este grupo de cobayos. De manera contraria, lo que observamos en el grupo de cobayos RV, es un establecimiento de la maquinaria contráctil altamente parecido al que se presenta en cobayos MA, con excepción de SERCA2b. Lo anterior permite identificar, que los cobayos RV, se encuentran preparados para la activación de la contracción del MLVA al momento en el que sean expuestos al alérgeno, tal como sucede en los cobayos MA, pero existen factores adversos, aún por identificar, que impiden obtener en algunas ocasiones una respuesta bronco-obstructiva.

8. CONCLUSIONES

Como se observó a lo largo de la tesis, la hiperreactividad de las vías aéreas (HVA) se encuentra aumentada en todos los grupos experimentales analizados en el modelo de asma agudo. En el caso de MYPT1, MYPT1-Thr⁸⁵⁰ y ROCK1, no se observaron aumentos significativos en su expresión para ningún grupo de cobayos experimentales, comparados con el grupo control, y, de acuerdo con estudios previos, se podrían descartar como principales mediadores de la HVA en el asma, incluso, a pesar de que ROCK1 sea la isoforma mayormente expresada en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA). Por otro lado, la forma fosforilada MYPT1-Thr⁶⁹⁶ podría estar relacionada con la diferencia de respuesta bronco-obstructiva en

el asma, al estar disminuida sólo en cobayos no respondedores (NR). Lo anterior también se observa para la bomba de calcio SERCA2b, aumentada solamente en cobayos con respuesta variable (RV) y no respondedores (NR). Para la isoforma ROCK2, el aumento significativo en los tres grupos de cobayos hiperreactores, y su correlación con el aumento de la HVA, recalca un papel importante de esta cinasa en la regulación de la HVA en el asma, independientemente de la respuesta bronco-obstruccioniva que se presente con la exposición al alérgeno. Finalmente, el establecimiento de la maquinaria contráctil en los grupos de cobayos NR y grupo control, resultó diferente, mientras que, en los grupos con modelo de asma (MA) y respuesta variable (RV), el comportamiento de las principales proteínas de la contracción fue muy parecido.

9. PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de MYPT1, MYPT1-Thr⁶⁹⁶ y MYPT1-Thr⁸⁵⁰, ROCK1, ROCK2 y SERCA2b mediante la técnica de Western Blot.
- Analizar la expresión de los inhibidores endógenos de la subunidad catalítica de la fosfatasa PP1c: CPI-17 y PHI-1.

10. REFERENCIAS

- Albaladejo-Méndez J. (2012). Volviendo a lo básico. *Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia*. Recuperado de http://www.ffis.es/volviendoalobasico/5gasto_cardiaco.html
- Alvarez-González M. (2019). *Caracterización de MYPT1 y su relación con la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. <http://132.248.9.195/ptd2019/abril/0787988/Index.html>
- Álvarez-Santos M. et al. (2015). Antigen-induced airways hyperresponsiveness and obstruction is related to caveolin-1 expression in airway smooth muscle in guinea pig asthma model. *Clinical and Traslational Allergy*. 5:14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431535/>
- Álvarez-Santos M. (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*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México <http://132.248.9.195/ptd2017/mayo/0759396/Index.html>
- Arias-Palomo E. (2008). *Análisis estructural de proteínas reguladoras de GTPasas de la superfamilia Ras mediante microscopía electrónica*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid http://digital.csic.es/bitstream/10261/40107/1/ARIAS_ERNESTO_TESIS.pdf
- Asenjo, C. y Pinto R. (2017). Características anatómo-funcionales del aparato respiratorio durante la infancia. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28 (1). 10-14
- Bazán-Perkins B. et. al. (2004). Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental Physiology*. 89(5). <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/expphysiol.2004.027706>
- Bazán-Perkins B. et al. (2009). Beta 1 integrins shedding in a guinea pig model in chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy*, 39, 740-751.
- Berair R. et al. (2013). Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. *BMC Medicine*. 11:145. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688527/#B48>
- Braman SS. The global burden of asthma. [Abstract]. *Chest*. (2006).130(1):4S-12S. <http://doi.org/d8bwqh>.

- Brannan J. y Loughheed M. (2012). Airway Hyperresponsiveness in Asthma: mechanisms, clinical significance and treatment. *Frontiers in Physiology*, 3: 460. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3517969/>
- Borak J. y Lefkowitz R.Y. (2016). Bronchial hyperresponsiveness. *Occupational medicine*, 66 (2). <https://academic.oup.com/occmed/article/66/2/95/2750597>
- Callén-Blecua M., Mora-Gandarillas I. (2017). Manejo Integral del asma. En: AEPap (ed.). Curso de Actualización Pediatría 2017. Madrid: Lúa Ediciones 3.0. p. 504.
- Chapman D. et al. (2014). Animal Models of Allergics Disease: Where Are Whe and Where to Netx?. *Journal of Cellular Biochemistry*, 15(12). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199895/>
- Chapman D.e Irvin C. (2016). Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in Asthma: the past, present and yet to come. *Clínical & Experimental Allergy*, 45 (4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386586/>
- Chelowa B.D., Liu X. y Ahmad N. (2013). The Role of polo-like-kinase 1 in carcinogenesis: cause or consequence. *Cancer Research*. 73 (23). <http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/23/6848.long>
- Chen C.P. et al. (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 (Pt3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324713/>
- Clinton-Webb R. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *American Physiological Society*, 27(4). https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00025.2003?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed
- Cockcroft D.W. y Davis B. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118 (3). [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(06\)01511-9/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(06)01511-9/fulltext)
- Del Río-Navarro B., Hidalgo-Castro E. y Sienna-Mongue L. (2009). Asma. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 66(1). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462009000100002
- De Toro G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *VIII Congreso Virtual*

<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/apoptosis.pdf>

- Dimitriech-Verin A. (2007). Regulation of Vascular Endothelial Cell Barrier Function and Cytoskeleton Structure by Protein Phosphatases of the PPP Family. *AJP Lung Cellular and Molecular Physiology*. 293(4).
https://www.researchgate.net/publication/6147067_Regulation_of_vascular_endothelial_cell_barrier_function_and_cytoskeleton_structure_by_protein_phosphatases_of_the_PPP_family
- Flores-Peredo L. et al. (2013). Participación de las Bombas de Calcio del Retículo Endoplásmico en el Cáncer. *REB*. 32(4). 137-144.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2013/reb134c.pdf>
- Gabella G. (1994). Anatomy of Airways Smooth Muscle. En Reaburn D. y Giembycz M.A. (Ed.). *Airways Smooth Muscle: Structure, Innervation and Neurotransmission*. (pp. 1-12). Basel, Boston, Berlín. Editorial Birkhäuser Verlag.
https://books.google.com.mx/books?id=8hzyBwAAQBAJ&pg=PA1&lpq=PA1&dq=Anatomy+of+Airways+Smooth+Muscle+Giorgio+Gabella&source=bl&ots=AtED3pUiOU&sig=Fj29_VpFaZ4s1zNUz0DblycKZZs&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj0w4T-t77cAhUFZawKHYnuB7sQ6AEwA3oECAMQAQ#v=onepage&q=Anatomy%20of%20Airways%20Smooth%20Muscle%20Giorgio%20Gabella&f=false
- García-Araque H. y Gutiérrez-Vidal S. (2015). Aspectos básicos del manejo de la vía aérea: anatomía y fisiología. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 38 (2). 99-102.
- García C.C. (2006). Las versátiles proteínas zinc *fingers*. *Revista Química Viva*. 1(5).
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n1/garcia.pdf>
- García-Grau E., Fusté-Escolano A. y Bados-López A. (2008). Manual de Entrenamiento en Respiración. *Facultat de Psicologia, Universitat de Barcelona*. (pp.8).
https://www.ttmib.org/documentos/ENTRENAMIENTO_EN_RESPIRACION.pdf
- García M.S. y Ruíz M.G. (2005). Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica*. 24(1). pp.5
[http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2005/01/e_4_11_MARIANA_SAUCEDO_GARCIA\[1\].pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2005/01/e_4_11_MARIANA_SAUCEDO_GARCIA[1].pdf)

- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. GINA. (2018). <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
- Grassie M.E. et. al. (2011). The Myosin Phosphatase Targeting Protein (MYPT) Family: A Regulated Mechanism for Achieving Substrate Specificity Of The Catalytic Subunit Of Protein Phosphatase Type 1 δ . *Archives Of Biochemistry and Biophysics*. 510 (2). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986111000427?via%3Dihub>
- Guerrero-Clorio S. (2018). *Características fisiopatológicas de los pulmones de cobayos atópicos con respuestas obstructivas variables a los retos antigénicos*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. <http://132.248.9.195/ptd2018/enero/0769508/Index.html>
- Hamelmann E. et.al. (1997). Noninvasive Measurement of Airway Responsiveness in Allergic Mice Using Barometric Plethysmography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 156(3). https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/ajrccm.156.3.9606031?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed
- Jia X. et al (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*. 94 (5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4939743/>
- Johnson J. et al. (2011). Chronic Respiratory Aeroallergen Exposure in Mice Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in the Large Airways. *PLOS ONE*. 6(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3024415/>
- Julian L. y Olson M. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases*. (5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4114931/>
- Lambert J. y Weifeng S. (2015). Ozone induced airway hyperresponsiveness: roles of ROCK isoforms. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309 (12). <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00353.2015>
- Loftus PA. y Wise SK. 2016. The global burden of asthma. [Abstract]. *Chest*. 130(1):4S-12S. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977741>

- Mahn K. et al. (2009). Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (26). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699374/>
- Mahn K. et al. (2010). Ca^{2+} homeostasis and structural and functional remodelling of airway smooth muscle in asthma. *BMJ Journals*, 65(6). <https://thorax.bmj.com/content/65/6/547>
- Martín-Lain N. (2012). *Reclutamiento de Unidades Motoras en Contracciones Concéntricas, Isométricas y Excéntricas*. (Tesis de pregrado). Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares. https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/11508/TFG_Mart%C3%ADn_La%C3%ADn_2012.pdf?sequence=1
- Matsumura F. y Hartshorne D. (2009). Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*. 369(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2367208/>
- Megía M. et al. (2017). Tejidos animales: Muscular. Atlas de histología vegetal y animal. Universidad de Vigo. (4-7 pp). España. <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/a-muscular.pdf>
- Ocampo J., Gaviria R. y Sánchez J. (2017). Prevalencia del asma en América Latina. Mirada crítica a partir del ISAAC y otros estudios. *Revista Alergia México*. 64(2). 189-192. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v64n2/2448-9190-ram-64-02-00188.pdf>
- Pacheco-Alba I. (2016). Alta expresión de laminina en el músculo liso bronquial y vascular pulmonar de cobayos no respondedores al reto antigénico. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. <http://132.248.9.195/ptd2016/mayo/0744367/Index.html>
- Pagiatakis C. et al. (2012). A Novel RhoA/ROCK-CPI-17-MEF2C Signaling Pathway Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 287(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318694/>
- Palmer J., Allen J. y Mayer O. (2004). Tidal Breathing Analysis. *Neoreviews*. 5(5). http://neoreviews.aappublications.org/content/5/5/e186?sso=1&sso_redirect_count=1&nfstatus=401&nftoken=00000000-0000-0000-0000-000000000000&nfstatusdescription=ERROR%3a+No+local+token

- Peti W. et al. (2013). Structural Basis for Protein Phosphatase 1 Regulation and Specificity. *HSS Public Access.* 280(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350600/>
- Postma D. y Kerstjens H. (1998). Characteristics of Airways Hyperresponsiveness in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,* 158 (2). https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac170
- Prakash Y. S. et al. (2009). Asthma and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ reuptake in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297(4) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3286227/>
- Quiao Y.N. et. al. (2014). Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Regulates the Contraction and Relaxation of Vascular Smooth Muscle and Maintains Blood Pressure. *Journal Biological Chemistry.* 289(32). <http://www.jbc.org/content/289/32/22512.long>
- Ramos-Ramirez P, Campos MG, Martinez-Cordero E, Bazan-Perkins B, Garcia-Zepeda E. 2013. Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Experimental lung research* 39:136-45).
- Reyes-Juárez J.L. y Zarain-Herzberg A. (2006). Función del Retículo Sarcoplásmico y su Papel en las Enfermedades Cardiacas. *Archivos de Cardiología de México.* 76(4). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402006000800003
- Rodríguez-Pinto M. (2005). El aparato respiratorio. *Anatomía, fisiología e higiene.* (pp. 71-75). México, D.F: Editorial Progreso.
- Rogers N.K., Clements D., Dongre A., Harrison T.W., Shaw D. y Johnson S.R. (2014). Extra-cellular matrix proteins induce matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) activity and increase airway smooth muscle contraction in asthma. *Public Library of Science (PLOS ONE),* 9(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938782/>
- Ryan G., Dolovich M. B., Roberts R. S., Frith P. A., Juniper E. F., Hargreave F. E., et al. (1981). Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *American Review of Respiratory Disease,* 123.

https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/arrd.1981.123.2.195?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed

- Sepúlveda-Justo M. (2006). *Análisis de la Localización y Función de las Bombas de Calcio y de sus Isoformas en el Cerebelo Adulto y en Desarrollo*. (Tesis doctoral). Universidad de Extremadura, Badajoz. <http://biblioteca.unex.es/tesis/8477237093.pdf>
- Sheller J.R.(2002). Regulation of the Airway Caliber. In: Bittar EE , ed. *Pulmonary Biology in Health and Disease* . New York: Springer; 64–76.
- 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. doi:10.1074/jbc.M110.122390
- Sieck G.C., White T.A., Thompson M.A., Pabelick C.M., Wylam M.E. y Prakash Y.S.(2008). Regulation of store-operated Ca²⁺ entry by CD38 in human airway smooth muscle. *American Journal Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294 (2). https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplung.00394.2007?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed#
- Slats A.M., Janssen K., Van Schadewijk A., Van der Plas D.T., Schot R., Van den Aardweg J.G., De Jongste J.C., Hiemstra P.S., Mauad T., Rabe K.F. y Sterk P.J. (2008). Expression of smooth muscle and extracellular matrix proteins in relation to airway function in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121 (5). [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(08\)00366-7/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(08)00366-7/fulltext)
- Sologuren N. (2009). Anatomía de la vía aérea. *Revista Chilena de anestesia*, 38. 78-80.
- SS Ann. et al. (2007). Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *European Respiratory Society Journal*. 29 (5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527453/>
- Torrealba-Rodríguez V., González-García R. y Marquina-Santos A. (2014). Uso de dispositivos supraglóticos para el manejo de la vía aérea. [Figura]. Recuperado de <http://www.zonates.com/es/revista-zona-tes/menu-revista/numeros-anteriores/vol-3--num-3--julio-septiembre-2014/articulos/uso-de-dispositivos-supragloticos-para-el-manejo-de-la-via-aerea.aspx>

- Vargas-Becerra M. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 68(S2):S91-S97. <http://www.mediagraphic.com/pdfs/neumo/nt-2009/nts092c.pdf>
- Vivolo-Aun M. et al. (2017). Animal models of asthma: utility and limitations. *Journal of Asthma and Allergy*. 2017:10. <https://www.dovepress.com/animal-models-of-asthma-utility-and-limitations-peer-reviewed-article-JAA>
- Wang F. y Sun Y. (2018). Overexpression of Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Inhibits Tumor Progression and Metastasis of Gastric Cancer. *Medical Science Monitor*. 24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937360/>
- Ward Y. y Kelly K. (2006). Gem proteín signalling and regulation. [Abstract]. *Methods and enzymology*. 407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757346>
- West J. M.D., Ph.D., D.S.C. (2012). Estructura y función: cómo la arquitectura del pulmón cumple su función. *Fisiología respiratoria*. Novena edición. (pp. 2-7).
- Wooldridge A. et al. (2004). Smooth Muscle Phosphatase Is Regulated in Vivo by Exclusion of Phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by Phosphorylation of Serine 695 in Response to Cyclic Nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (33). <http://www.jbc.org/content/279/33/34496.long>
- Yick C.Y., Zwinderman A.H., Kunst P.W., Grunberg K., Mauad T., Chowdhury S., Bel E.H., Baas F., Lutter R. y Sterk P.J. (2014). Gene expression profiling of laser microdissected airway smooth muscle tissue in asthma and atopy. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Allergy*, 69 (9). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.12452>
- Yuen S. (2011). MYPT1 Protein Isoforms Are Differentially Phosphorylated by Protein Kinase G. *Journal of Biological Chemistry*. 286(43). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3199474/>
- Zhu M. et al. (2011). Role of Rho Kinase Isoforms in murine allergic airway responses. *European Respiratory Society Journal*. 38 (4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263528/>

