



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EXPRESIÓN DE LAMININA EN EL MÚSCULO LISO DE LA VÍA AÉREA Y
VASCULAR INTRAPULMONAR DE COBAYOS RESPONDEDORES Y NO
RESPONDEDORES AL RETO ANTIGÉNICO**

TESIS

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

PRESENTA:
BIÓL. PACHECO ALBA IVONNE

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

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , 2022



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/307/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **PACHECO ALBA IVONNE** con número de cuenta **307224534** con la tesis titulada **“EXPRESIÓN DE LAMININA EN EL MÚSCULO LISO DE LA VÍA AÉREA Y VASCULAR INTRAPULMONAR DE COBAYOS RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES AL RETO ANTIGÉNICO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Vocal: DRA. VERÓNICA ESTELA CARBAJAL SALINAS
Vocal: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
Vocal: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
Secretario: DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de abril de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM:

La realización de este trabajo fue posible gracias a la oportunidad, conocimiento y apoyo brindado por el programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM., que año con año contribuye con el engrandecimiento científico del país.

Al CONACYT por el apoyo económico:

Durante los estudios de maestría la sustentante recibió apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, apoyo Núm. 816188).

A mi tutora:

Agradezco a la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins por brindarme la invaluable oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su dirección y consejo durante la realización de la tesis.

A los miembros de mi comité tutorial:

Agradezco infinitamente a la Dra. María Sandra Cabrera Benítez y al Dr. Víctor Manuel Ruiz López por ser Miembros del Comité Tutor durante la realización de este trabajo. Muchas gracias por su orientación y tiempo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER).

Agradezco a la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins por todas sus enseñanzas, su apoyo y guía durante la realización del proyecto, y por estar presente durante esta etapa de mi vida.

A la Dra. Angélica Flores Flores que ha estado presente con su invaluable amistad a lo largo de mi crecimiento profesional. Gracias por todos los buenos momentos que compartimos.

A Erika Liliana Monterrubio Flores, Guadalupe Hiriart Valencia (laboratorio de morfología, INER) y al MVZ. Alberto Pizaña (jefe de Bioterio, INER) por su apoyo, amistad y sobre todo por sus invaluable consejos que siempre formarán parte de mi vida. Me siento profundamente agradecida por haberlos conocido.

Agradezco profundamente a los miembros de mi jurado: Dra. María de Lourdes Segura, Dra. Verónica Estela Carbajal, Dra. Leda Carolina Torres, Dra. María Sandra Cabrera y el Dr. Víctor Ruiz, por el tiempo y trabajo que invirtieron leyendo mi tesis y brindándome su conocimiento y experiencia, mejorando el presente trabajo. Aprendí mucho de ellos durante este proceso.

Al equipo de trabajo del laboratorio de hiperreactividad bronquial (INER) por su compañía y ayuda, formaron parte muy importante de mi vida diaria durante la maestría.

A mi familia: a mi mamá María de Jesús Alba Gutiérrez, quién siempre me apoya para salir adelante en los momentos más difíciles con todo su amor y comprensión, gracias por siempre estar ahí, dándome los consejos y momentos más importantes y hermosos de mi vida; a mi papá Rosendo Pacheco Ortiz por todo el amor, esfuerzo y paciencia, ambos hemos aprendido mucho uno del otro. Me siento muy afortunada y orgullosa de tener padres tan maravillosos. A mis hermanos: Geovanni Pacheco Alba y Víctor Alfonso Pacheco Alba por estar presentes a lo largo de mi vida, gracias su cariño, por los buenos momentos, las enseñanzas y por escucharme. ¡Son lo más hermosos de mi vida! sigamos creciendo juntos.

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que tengo en la vida, por permitirme conocer personas maravillosas, por las que, junto con su ayuda, me permitieron llegar hasta este momento.

Agradezco a la familia Alba Gutiérrez a los que están: gracias por que a pesar de la distancia y dificultades se preocupan por mi bienestar, a los que perdimos, gracias por el amor brindado mientras pudimos estar juntos, con su partida me dejaron nuevas y grandes aprendizajes.

“La felicidad procede de una bondad esencial que desea que cada persona encuentre sentido a su existencia” Matthieu Ricard.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE CUADROS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Vías aéreas	5
1.2 Participación del músculo liso de la vía aérea (MLVA) en la respuesta de contracción	5
1.3 Reactividad e hiperreactividad del MLVA	8
1.4 La matriz extracelular (MEC)	9
1.5 Relación de la MEC con el MLVA	10
1.6 Laminina	13
1.6.1 Funciones de la laminina	20
1.6.2 Laminina en el pulmón	20
1.6.3 Alteraciones patológicas de la expresión de laminina en las vías aéreas	22
1.7 Antecedentes. Modelo en cobayos sensibilizados: respondedores (R, modelo de asma) y no respondedores (NR) al reto antigénico	23
1.7.1 Laminina en cobayos respondedores y no respondedores al reto antigénico ...	26
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPOTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1 Animales	29
5.2 Modelo respondedor al reto antigénico	29
5.2.1 Pletismografía barométrica	30
5.2.2 Reactividad de las vías aéreas	33
5.3 Obtención de muestras	34
5.4 Conteo celular diferencial	35
5.5 Inmunohistoquímicas (IHC)	35
5.5.1 Análisis de expresión semi- cuantitativa de laminina (expresión por intensidad de tinción)	37
5.6 Análisis estadísticos	39

6. RESULTADOS	40
6.1 Respuestas bronco-obstructivas a los retos antigénicos	40
6.2 Reactividad de las vías aéreas. Los cobayos NR crónicos no presentan hiperreactividad de la vía aérea	41
6.3 Células inflamatorias en los R y NR al reto antigénico	43
6.4 Expresión de las isoformas de laminina (LN).....	44
6.4.1 Isoforma LN α 1	45
6.4.2 Isoforma LN α 2	47
6.4.3 Isoforma LN α 4	49
6.4.4 Isoforma LN β 3.....	51
6.4.5 Isoforma LN γ 1	53
6.4.6 Isoforma LN γ 2.....	55
6.4.7 Otras isoformas de laminina	57
6.5 Expresión de las isoformas de laminina y los posibles trímeros de laminina en cobayos controles, respondedores R y NR	57
7. DISCUSIÓN	60
7.1 Respuesta bronco-obstructiva a los retos antigénicos en el modelo R y NR	60
7.2 Expresión de las isoformas de laminina por IHC en cobayos	60
7.3 Las isoformas de laminina se expresan principalmente dentro del MLVA y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI)	62
7.4 Las isoformas de laminina expresadas en cobayos R y NR están asociadas a distintas posibles funciones	63
7.4.1 Los cobayos R sobre expresan principalmente isoformas LN α 1 y LN α 2 en el MLVA y MLVI	63
7.4.2 Los cobayos NR sobre expresan principalmente isoformas LN β 2 y LN β 3 en el MLVA y MLVI	65
7.4.3 La isoforma LN γ 1 se incrementó solo en el MLVI de cobayos R y NR	63
8. CONCLUSIÓN	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías aéreas	6
Figura 2. Contracción del músculo liso por receptores acoplados a proteínas G.....	7
Figura 3. Matriz extracelular (MEC)	10
Figura 4. Organización de los filamentos de actina y miosina en una célula de músculo liso	12
Figura 5. Heterotrímeros de laminina.....	14
Figura 6. Clasificación de las lamininas	17
Figura 7. Interacción laminina- célula	18
Figura 8. Distribución de laminina en el pulmón.....	21
Figura 9. Respuesta bronco-obstruiva en cobayos respondedores (R) y no respondedores (NR) al reto antigénico	24
Figura 10. Características de cobayos R y NR en un modelo crónico.....	25
Figura 11. Modelo experimental.....	30
Figura 12. Pletismografía barométrica	31
Figura 13. Cambios de presión dentro de la cámara pletismográfica	32
Figura 14. Curvas dosis- respuesta a histamina.....	34
Figura 15. Análisis semicuantitativo de la intensidad de marca en las inmunotinciones... 38	
Figura 16. Respuesta bronco-obstruiva antes y después de los retos antigénicos con ovoalbúmina (OVA)	40
Figura 17. Respuesta bronco-obstruiva máxima alcanzada después del reto antigénico en cobayos sensibilizados.....	41
Figura 18. Reactividad de las vías aéreas de los cobayos ante curvas dosis- respuesta de histamina.....	42
Figura 19. Conteo celular diferencial en lavado bronco- alveolar (LBA).....	44
Figura 20. Expresión de la isoforma LN α 1 en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI).....	46
Figura 21. Inmunolocalización de la isoforma LN α 1 en epitelio de la vía aérea y parénquima	47
Figura 22. Expresión de la isoforma LN α 2 en MLVA y MLVI	48
Figura 23. Inmunolocalización de la isoforma LN α 2 en epitelio de la vía aérea y parénquima	49
Figura 24. Expresión de la isoforma LN α 4 en MLVA y MLVI	50
Figura 25. Inmunolocalización de la isoforma LN α 4 en mesotelio pulmonar.....	51
Figura 26. Expresión de la isoforma LN β 3 en MLVA y MLVI	52

Figura 27. Inmunolocalización de la isoforma LN β 3 en epitelio de la vía aérea y parénquima	53
Figura 28. Expresión de la isoforma LN γ 1 en MLVA y MLVI.....	54
Figura 29. Inmunolocalización de la isoforma LN γ 1 en epitelio de la vía aérea, parénquima y mesotelio.....	55
Figura 30. Expresión de la isoforma LN γ 2 en MLVA y MLVI.....	56
Figura 31. Inmunolocalización de la isoforma LN γ 1 en epitelio de la vía aérea y parénquima	57
Figura 32. Expresión y localización de las isoformas de laminina en distintas estructuras de pulmón de cobayos controles, R y NR al reto antigénico.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nomenclatura y composición de los heterotrímeros de laminina.....	11
Cuadro 2. Regulación de las funciones de células inmunológicas por distintos trímeros de laminina.....	15
Cuadro 3. Anticuerpos utilizados.....	32

ABREVIATURAS

MB	Membrana basal
MLVA	Músculo liso de la vía aérea
IP ₃	Inositol trifosfato
Ca ²⁺	Ión calcio
GPCR	Receptores ligados a proteínas G
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina (por <i>myosin light-chain kinase</i>)
FEV1	Volumen espiratorio forzado al primer segundo (por <i>forced expiratory volume</i>)
MEC	Matriz extracelular
IL	Interleucinas
MLVI	Músculo liso vascular intrapulmonar
MMP	Metaloproteinasas de matriz (por <i>matrix metalloproteinases</i>)
DG	Distroglicano
FAK	Cinasa de adhesiones focales (por <i>focal adhesion kinase</i>)
LN	Laminina (isoforma de una cadena monomérica)
LE	Dominios LE de laminina
EGF	Factor de crecimiento epidermal (por <i>epidermal growth factor</i>)
SGL	Glicolípidos sulfatados (por <i>sulfated glycolipid</i>)
LG	Dominios globulares de laminina
AKT	Proteína cinasa B
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno (por <i>mitogen activated protein kinase</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial (por <i>endothelial growth factor</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (por <i>platelet-derived growth factor</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (por <i>fibroblast growth factor</i>)

R	Cobayos respondedores al reto antigénico
NR	Cobayos no respondedores al reto antigénico
OVA	Ovoalbúmina
SSF	Solución salina fisiológica
ÍB	Índice de bronco-obstrucción
LBA	Lavado bronco-alveolar
IHC	Inmunohistoquímica (por <i>immunohistochemistry</i>)
TBS	Buffer de solución salina con tris (<i>tris buffered saline</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (por <i>horseradish peroxidase</i>)
DAB	Diaminobencidina
AEC	Aminoetilcarbazol
DP200	Dosis provocativa 200
TGF - β	Factor de crecimiento transformante β (por <i>transforming growth factor β</i>)

RESUMEN

La laminina es una glicoproteína heterotrimérica, abundante en membrana basal (MB), compuesta por una cadena α , de la cual hay 5 isoformas: LN α 1, LN α 2, LN α 3, LN α 4 y LN α 5, una cadena β y una cadena γ , con tres isoformas cada una: LN β 1, LN β 2 y LN β 3, y LN γ 1, LN γ 2 y LN γ 3 respectivamente. En el pulmón la laminina se encuentra, principalmente en la MB subepitelial y en el intersticio que rodea al músculo liso de la vía aérea (MLVA) y al músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI), donde interactúa con receptores celulares regulando diversas funciones, como la supervivencia y la contracción. Los pacientes y animales modelos de asma, se caracterizan por presentar modificaciones de elementos de la MB y cambios fisiológicos en el MLVA y en el MLVI. Aún es poco conocido como los elementos de la MB modifican el comportamiento del músculo liso, los cambios en alguna isoforma de laminina podrían estar asociada con cambios fisiológicos del músculo.

Para evaluar la expresión de laminina y los cambios en el músculo liso, se usaron cobayos, los cuales fueron sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y expuestos a doce retos antigénicos con OVA nebulizada. Los animales fueron separados en dos grupos ($n=6$, por grupo, incluyendo el grupo control) de acuerdo con la respuesta obstructiva desarrollada después del reto antigénico: los cobayos respondedores (R, modelo de asma) que se caracterizan por presentar bronco-obstrucción después del reto antigénico, hiperreactividad del músculo liso a la histamina, remodelación del MLVI y respuestas de linfocitos Th2 y eosinófilos, y los cobayos no respondedores (NR), que no presentan respuestas bronco-obstructivas ante el reto antigénico, hiperreactividad, ni inflamación Th2, pero sí remodelación del MLVI y presencia de neutrófilos. De estos grupos se obtuvo tejido pulmonar, donde se analizó la presencia de las distintas isoformas de laminina en el MLVA y MLVI mediante inmunohistoquímicas (IHC). La intensidad de tinción generada por la IHC fue analizada de manera semicuantitativa con el programa *ImageJ*. Los cobayos del grupo R, principalmente presentaron incremento en la intensidad de tinción de isoformas LN α 1 ($p<0.01$), LN α 2 ($p<0.05$) en ambos músculos lisos, y LN γ 1 ($p<0.05$) en MLVI. Por otro lado, en los cobayos NR, principalmente se observó un incremento en la intensidad de tinción de LN β 2 y LN β 3 ($p<0.01$) en MLVA y MLVI. El incremento en la intensidad de tinción de distintas

isoformas de laminina en MLVA y MLVI en los grupos R y NR, sugiere que puede haber un incremento en la expresión (cuantificable) de la cantidad de laminina en los músculos lisos, aunque es necesario realizar otros estudios para asegurarlo. Por otra parte, el MLVA y MLVI de cobayos R y NR, que presentan diferencias fisiológicas, tiene incrementos en la tinción para distintas isoformas de laminina; esto sugiere que las isoformas de laminina pueden estar relacionada con las distintas respuestas fisiológicas de contracción que se observan en estos grupos. LN α 1 y LN α 2 han sido relacionadas con la supervivencia y contracción, por lo que la sobre expresión observada en los grupos R podría facilitar la contracción el MLVA. Por otro lado, la acumulación de LN β 2 y LN β 3 parece estar más relacionada con el aumento de la distensibilidad del MLVA, por lo que su acumulación en MLVA puede evitar su contracción y por tanto evitar la hiperreactividad en el modelo NR.

ABSTRACT

Laminin is a heterotrimeric glycoprotein, abundant in the basement membrane (BM), composed of an α chain, of which there are 5 isoforms: LN α 1, LN α 2, LN α 3, LN α 4 and LN α 5, a β chain and a γ chain, with three isoforms each. one: LN β 1, LN β 2 and LN β 3, and LN γ 1, LN γ 2 and LN γ 3 respectively. In the lung, laminin is found mainly in the subepithelial BM and in the interstitium that surrounds the airway smooth muscle (ASM) and the intrapulmonary vascular smooth muscle (IVSM), where it interacts with cell receptors regulating various functions, such as survival and contraction. The patients and animal models of asthma are characterized by presenting modifications of elements of the BM and physiological changes in the ASM and in the IVSM. It is still little known how BM elements modify the behavior of smooth muscle, changes in some isoform of laminin could be associated with physiological changes in muscle.

To evaluate laminin expression and changes in smooth muscle, guinea pigs were used, which were sensitized with ovalbumin and exposed to twelve antigenic challenges with nebulized ovalbumin. The animals were separated into two groups (n=6, per group, including the control group) according to the obstructive response developed after the antigenic challenge: the responder guinea pigs (R, asthma model) that are characterized by presenting broncho-obstruction after antigen challenge, smooth muscle hyperreactivity to histamine, IVSM remodeling, and Th2 and eosinophil responses, and non-responder (NR) guinea pigs, which do not have broncho-obstructive responses to antigen challenge, hyperreactivity, or Th2 inflammation, but IVSM remodeling and presence of neutrophils. Lung tissue was obtained from these groups, where the presence of the different laminin isoforms in ASM and IVSM was analyzed by immunohistochemistry (IHC). The intensity of staining generated by IHC was analyzed semiquantitatively with the ImageJ program. The guinea pigs of the R group mainly presented an increase in the intensity of staining of isoforms LN α 1 (p<0.01), LN α 2 (p<0.05) in both smooth muscles, and LN γ 1 (p<0.05) in IVSM. On the other hand, in NR guinea pigs, mainly an increase in the staining intensity of LN β 2 and LN β 3 (p<0.01) was observed in ASM and IVSM. The increase in the intensity of staining of different isoforms of laminin in ASM and IVSM in the R and NR groups, suggests that there may be an increase in the expression (measurable) of the amount of laminin in smooth muscles, although it is necessary to perform other tests to ensure. On the other hand,

NR guinea pigs, an increase in the intensity of staining of LN β 2 and LN β 3 was observed ($p < 0.01$) in ASM and IVSM. The increase in the intensity of staining of different isoforms of laminin in ASM and IVSM in the R and NR groups, suggests that there may be an increase in the expression (quantitative) of the amount of laminin in smooth muscles, although it is necessary to perform other studies to ensure it. Also, the ASM and IVSM of R and NR guinea pigs, which show physiological differences, have increases in staining for different laminin isoforms; this suggests that laminin isoforms may be related to the different physiological contraction responses observed in these groups. LN α 1 and LN α 2 have been related to survival and contraction, so the overexpression observed in the R groups could facilitate contraction in ASM. On the other hand, the accumulation of LN β 2 and LN β 3 seems to be more related to the increase in ASM distensibility, so their accumulation in ASM can prevent its contraction and therefore avoid hyperreactivity in the NR model.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías aéreas

Las vías aéreas, o respiratorias, son una serie de conductos continuos y ramificados que tienen como principal función la captación y conducción del oxígeno en el aire inspirado hasta la zona de intercambio gaseoso y posteriormente la eliminación de dióxido de carbono producido por el metabolismo celular del organismo. Anatómicamente se dividen en vías aéreas superiores e inferiores (Fig. 1a) (Gaga, 2001; Mindt, 2018). Histológicamente, las vías aéreas inferiores están formadas por 4 capas bien definidas (Fig. 1b): 1) la capa mucosa, formada por epitelio ciliado pseudoestratificado y membrana basal (MB), 2) la capa submucosa, que se encuentra adyacente al epitelio y se caracteriza por contener tejido conectivo y glándulas, 3) la capa cartilaginosa (abundante en tráquea) y muscular, ambas abundantes en bronquios, pero en bronquiolos la cartilaginosa es ausente, y 4) una capa adventicia, constituida por tejido conectivo denso (Mindt, 2018; Ross, 2011).

Las vías aéreas son capaces de responder a diferentes estímulos llevando a cabo diversas respuestas; la secreción de moco, el inicio de respuestas inflamatorias y la contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) son las respuestas fisiológicamente más notables (Gaga, 2001; Ross, 2011).

1.2 Participación del músculo liso de la vía aérea (MLVA) en la respuesta de contracción

El MLVA mantiene el calibre, o tono, de las vías aéreas, a través de la regulación de la contracción, evitando el colapso de la estructura para permitir el flujo continuo de aire en el pulmón (Pierce, 2000; O'Byrne, 2003; Amrani, 2003; Lauzon, 2016).

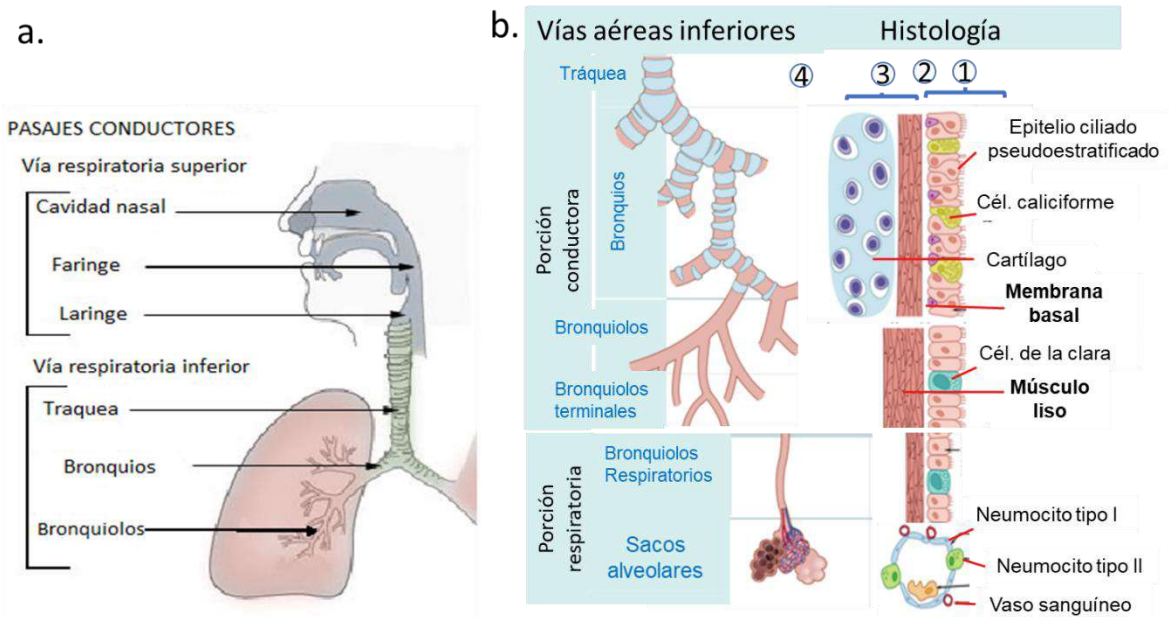


Figura 1. Vías aéreas. a. División anatómica de las vías aéreas. b. Características histológicas de las vías aéreas. Histológicamente las vías aéreas inferiores se forman principalmente por cuatro capas. ① La capa mucosa, formada por células epiteliales y células caliciformes que se encuentran en contacto directo con la luz de la vía aérea. ② La capa submucosa formada por tejido conectivo y glándulas. ③ Capa cartilaginosa (en tráquea) /muscular (en bronquios y bronquiolos) y ④ Capa adventicia (no mostrada). Modificada de US National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) 2015. <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/respiratory/passages> & El Husseiny's. *Essentials for Respiratory System*, 2018 ebook.

La contracción del MLVA inicia cuando un mediador o agonista que induce la contracción, como la acetilcolina, metacolina, histamina, bradicina, serotonina, entre otros, se une a receptores ligados a proteínas Gq/11 en el miocito (GPCR), provocando la activación de fosfolipasa C, que lleva a la formación de inositol trifosfato (IP₃). El aumento de IP₃ provoca la liberación de calcio (Ca²⁺) del retículo sarcoplásmico; el Ca²⁺ liberado se une a calmodulina y esta a su vez a la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Una vez formado el complejo Ca²⁺-calmodulina-MLCK se lleva a cabo la fosforilación de la serina 19 de la cadena ligera de miosina, lo que permite la actividad de ATPasa de miosina para la reacción de puentes cruzados entre actina y miosina, lo que contrae el miocito (Fig. 2) (Kudo, 2013; Gunts, 2000). La liberación de mediadores de la contracción, como la acetilcolina, y mediadores relajantes, como la

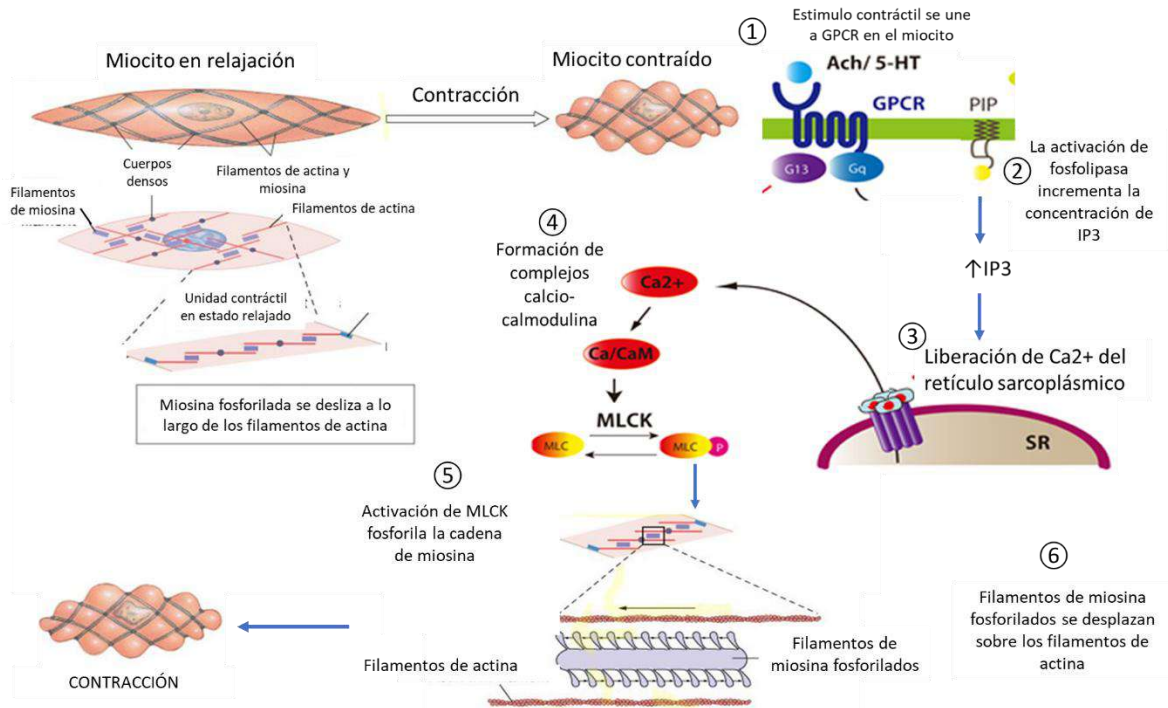


Figura 2. Contracción del músculo liso por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los filamentos de actina se distribuyen a lo largo del citoplasma del miocito; cuando estos se entrecruzan con filamentos de miosina se forman estructuras llamadas “cuerpos densos” que son la unidad funcional de la contracción del miocito. ① La presencia del ligando de los GPCR, por ejemplo, acetilcolina (ACh) en los receptores colinérgicos o serotonina (5-HT) en los serotoninérgicos, ② activa a la subunidad Gq de proteínas G, induciendo la actividad catalítica de la que fosfolipasa C (PLC), la cual dirige la formación de inositol 3 fosfato (IP3) a partir de fosfatidil inositol bifosfato (PIP). ③ El incremento de IP3 provoca la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SR). ④ Una vez en el citosol, el Ca²⁺ forma complejos con calmodulina (Ca/CaM). ⑤ Estos complejos activan a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) ⑥ una vez fosforilados, los filamentos de miosina se desplazan sobre los filamentos de actina, acortando la longitud del miocito, provocando la contracción. MLC: cadena ligera de miosina, MLCp: Cadena ligera de miosina en estado fosforilado. Modificado de https://www.wikilectures.eu/w/File:Actin_myosin_filaments.png & Kudo, M. et al. *Front Micro Biol.* 2013; 4 (263): 1- 16

adrenalina, a través del sistema nervioso autónomo parasimpático y simpático, respectivamente, así como otros mediadores no-adrenérgicos, no-colinérgicos, conocido como sistema NANC, permiten mantener el tono de la vía aérea a través de una contracción basal y controlada del MLVA (Thirstrup, 2000).

1.3 Reactividad e hiperreactividad del MLVA

La capacidad de contracción del MLVA a agonistas contráctiles es conocida con el término de “reactividad de la vía aérea”. La reactividad puede ser medida mediante la construcción de curvas dosis- respuesta a un agonista constrictor conocido, por ejemplo: histamina o metacolina. El grado de contracción del MLVA producido tras la inhalación de concentraciones crecientes del agonista se ve reflejado en la disminución del volumen de aire espirado forzado en 1 segundo (FEV1, por Forced expiratory volume in 1 second). En animales la reactividad se mide por pletismografía barométrica que determina los cambios en la resistencia del flujo de aire ante los agentes constrictores (Tordera, 2004; O’Byrne, 2003; Grootendorst, 2004; Cockcroft, 2010).

Tanto en humanos como en animales la reactividad es un parámetro altamente informativo que expresa el grado de obstrucción de la vía aérea, y brindan información sobre la función pulmonar normal o posibles cambios que se pudieran presentar por enfermedades pulmonares (Tordera, 2004; O’Byrne, 2003; Grootendorst, 2004; Cockcroft, 2010). Uno de los mayores cambios reflejados en estos estudios es la hiperreactividad (de la vía aérea), definida como un estrechamiento excesivo de la vía aérea, ante estímulos que habitualmente sólo provocan una respuesta escasa o nula, provocando disminución en el flujo de aire. La hiperreactividad es una característica de enfermedades inflamatorias obstructivas como el asma y el EPOC provocando incremento en la obstrucción del flujo de aire (Dekkers, 2009; Lloyd, 2007; Tordera, 2004; O’Byrne, 2003).

Aunque el mecanismo preciso que induce la hiperreactividad de la vía aérea aún se desconoce, se cree que puede depender de factores como: disfunción en la neuro regulación, cambios estructurales e inflamación (Lauzon, 2016; Kuo 2003). En individuos con asma la inflamación con linfocitos TCD4+, mastocitos/células cebadas, interleucinas (IL) como IL-13 e IL-17 ha sido asociadas con el incremento de la contracción (Kudo, 2013; Lauzon, 2016; Tliba, 2003; Abbas, 2015); aunque esta relación ha sido cuestionada debido a que se han encontrado incrementos en la contracción sin presencia de células inflamatorias (Tordera, 2004; Brusasco, 2001; Lauzon, 2016).

Aunque muchos factores han sido propuestos para explicar la hiperreactividad, resulta evidente que el MLVA tiene un papel central en la contracción. Además, es sabido que el MLVA puede alternar entre fenotipos contráctiles y proliferativos, y que ambos pueden contribuir con el desarrollo de hiperreactividad. Particularmente en su fenotipo proliferativo el MLVA modula la producción de factores inflamatorios y elementos de la MEC, los cuales se encuentran alterados en el asma y han sido asociados al aumento de la contracción (Prakash, 2016; Lauzon, 2016; Tliba, 2009; Parameswaran, 2006). En este aspecto, diversos estudios han resaltado la importancia e influencia que la MEC tiene sobre los miocitos, debido a que su composición y rigidez afecta directamente procesos celulares, bioquímicos y biomecánicos, entre los cuales se encuentra la contracción (Schuliga, 2015; Tliba, 2009; Lauzon, 2016; Prakash, 2016; Grootendorst; 2004).

1.4 La matriz extracelular (MEC)

La MEC es el componente no celular presente en todos los tejidos, que no solo da estructura y soporte, sino integra a las células como tejidos, y regula distintos procesos como proliferación, migración o apoptosis, además de ser reservorio de factores de crecimiento. Se trata de una red heterogénea de proteínas y glicoproteínas que proporciona soporte físico a las células (Frantz, 2010; Bonnans, 2014). Su composición, tanto por cantidad como por el tipo de sus componentes, además de su organización y arreglo, varía específicamente para cada tejido, así como por el estado de desarrollo en que se encuentre. Por su localización y composición la MEC se divide en dos estructuras: la matriz intersticial y la MB (Fig. 3) (Lu, 2011; LeBleu, 2007; Vaday, 2001). La matriz intersticial se refiere al tejido conectivo que une grandes estructuras celulares; en el pulmón se encuentra formando la capa submucosa y adventicia, y se compone principalmente por colágenos I, II, III y V, elastina, proteoglicanos y fibronectina, formando estructuras altamente hidratadas (Kular, 2014; Bonnans, 2014). Por otro lado, la MB es una capa delgada de MEC muy especializada que se encuentra en contacto directo con las células a través de receptores celulares, principalmente integrinas. En el pulmón, se encuentra debajo de los epitelios, endotelios y rodeando a las células del

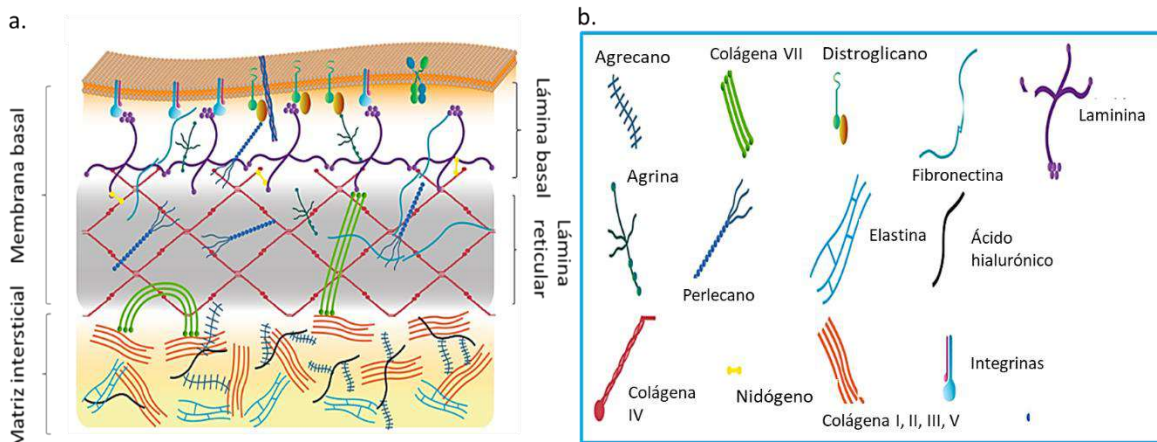


Figura 3. Matriz extracelular (MEC). La MEC se diferencia bioquímica y morfológicamente en membrana basal, que se localiza adyacente a las células epiteliales, endoteliales y rodeando a células de músculo liso, y en matriz intersticial. En este esquema se muestran los principales componentes y distribución tanto de proteínas como de proteoglicanos en las distintas divisiones de la MEC. Modificada de Barber et al., *Nutrients*. 2014; 6 (11).

músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI) y del MLVA. Los componentes más abundantes que forman la MB son: colágena IV, nidógeno/ entactina, perlecano y laminina (Fig. 3), otros componentes menos abundantes incluyen, colágena XV y XVII, agrina y fibulina (LeBleu, 2007; Kalluri, 2003; Yue, 2014; Halfer, 2015).

En el pulmón, la MEC tiene diversas funciones. En un contexto macroscópico la matriz intersticial, y en menor medida la MB, provee soporte estructural y elasticidad, al dar baja resistencia al flujo de aire, lo que facilita el correcto intercambio gaseoso (Pelosi, 2007; Balestrini, 2015; Zhou, 2017). A nivel celular, por su unión directa a las células, la MB es capaz de regular diversas vías de señalización encargadas de dirigir procesos celulares involucrados en la proliferación, diferenciación, síntesis de proteínas, migración, supervivencia, etc. (Prakash, 2016; Grootendorst, 2004; Balestrini, 2015; Nguyen, 2005; Freyer, 2001; Schuliga, 2003).

1.5 Relación de la MEC con el MLVA

Diversos estudios demuestran que los miocitos pueden modular la homeostasis de su MB ya que son capaces de expresar y liberar proteínas de MB como fibronectina, perlecano, elastina, laminina, trombospondina, condroitin sulfato colágenas (I, II, III, IV

y V), versicano y decorina, además de metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) (Johnson, 2000; Howarth, 2004; Parameswaran, 2006). A su vez, se ha visto que la MB regula las funciones del MLVA al proveer señales bioquímicas y biomecánicas que inducen la activación de diversas vías de señalización al interior de la célula (Balestrini, 2015).

Los receptores transmembranales, como distroglicanos (DG) y en mayor medida integrinas, conectan a la MB con el citoesqueleto de actina en el interior del miocito, sin embargo, la unión integrina-actina no es de forma directa, pues depende de la formación de “complejos de adhesión o placas densas” formadas en la membrana citoplasmática de la célula (Gunts, 2008; Tang, 2015; Zhang, 2008). Los complejos de adhesión son un conjunto de proteínas, transductoras y mecanorresponsivas, de composición molecular variable. Generalmente, entre las proteínas más importantes que lo conforman se encuentran: la cinasa de adhesiones focales (FAK), WASp, talina, vinculina, paxilina, α -actinina y Abl (Fig. 4) (Schiller, 2013; Martino, 2018; Schuliga, 2015). Adicionalmente, las proteínas estructurales y de señalización, en estos complejos, forman uniones y regulan la polimerización y reordenamiento con dos tipos de filamentos de actina: los filamentos de actina asociados con miosina y filamentos de actina con unión a otras proteínas de citoesqueleto como microtúbulos o queratina (Zhang, 2014; Critchley, 2000). Algunas de las vías de señalización reguladas por la unión de MB es la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que, ha sido involucrada con la proliferación y contracción del músculo liso por modificación o polimerización de filamentos de α -actina (Fig. 4b) (Jia, 2012; Tang, 2015; Wang, 2013).

La acumulación de MEC en el MLVA puede alterar las propiedades de contracción, independientes de la contracción por GPCR, además de regular diferencialmente su supervivencia, proliferación, migración, maduración y síntesis de citocinas, resultando en una disminución de la función pulmonar (Rosmark, 2018; Prakash, 2016; Burgstaller, 2016; Tliba, 2009; Dekkers, 2009; Martino, 2018). Con relación a la contracción, diversos estudios indican que componentes de la MEC como fibronectina, colágena I y IV, vitronectina y lamininas pueden regular la contracción al regular la polimerización de actina unida a la miosina (Fig. 4b), o por inducir el cierre o apertura de canales iónicos

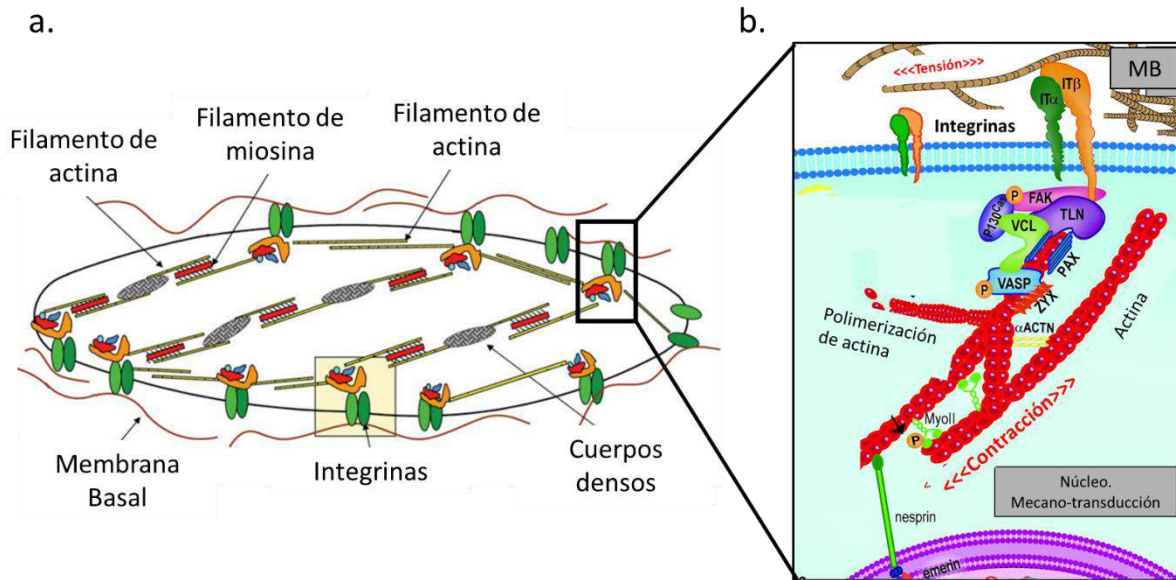


Figura 4. Organización de los filamentos de actina y miosina en una célula de músculo liso. a) Los complejos de adhesión conectan a la membrana basal (MB) que rodea a la célula a los filamentos de actina dentro de la célula. b) Detalle de las proteínas más importantes que forman a los complejos de adhesión. Los filamentos de actina están unidos a las integrinas por proteínas dentro de complejos macromoleculares al interior de la membrana celular. La actina que interactúa con filamentos de miosina genera tensión y contracción celular al regular la apertura de canales iónicos o por la polimerización de actina. Adicionalmente, la actina que no se une a miosina puede regular la forma y proliferación celular, al enviar señales al núcleo para la activación de genes. Los complejos de adhesión son un conjunto de proteínas que incluyen FAK: cinasa de adhesiones focales (focal adhesión kinase), TLN: Talina, VCL: Vinculina, PAX: Paxilina, ZYX: Zyxina, α -ACTN: α Actinina, VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (Vasodilator-stimulated phosphoprotein), P130^{Cas}: Proteína adaptadora tirosin cinasa, WASP: proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich (Wiskott-Aldrich syndrome proteins) Modificada de Barber et al., *Nutrients*. 2014; 6 (11), Martino, F. et al. *Front Physiol*. 2018; 9 (824): 1- 20. & Zhang, W., et al. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5: 32- 39.

cambiando la polaridad de la membrana (Tang, 2015; Zhang, 2008; Gunts, 2008; Schuliga, 2015; Parameswaran, 2006; Hirts, 2000).

Así mismo la modificación de la tensión mecánica impuesta por la MB estimula el reclutamiento de integrinas y proteínas para la formación de complejos de adhesión, aumentando el número de interacciones y por tanto ejerciendo mayor tensión en el citoesqueleto y la membrana del miocito potenciando estas señales mecánicas (Deng, 2005; Zhang, 2008; Tang, 2015).

Las enfermedades obstructivas como asma y EPOC, con inflamación persistente, desarrollan cambios estructurales permanentes de la vía aérea conocidos como remodelación, uno de estos cambios es la acumulación de MB subepitelial y en el MLVA. La acumulación de MB en el MLVA se asocia a alteraciones de la función pulmonar ya que algunos elementos de la MB muestran propiedades que pueden

contribuir al aumento de la contracción y la supervivencia del miocito (Parameswaran, 2006; Dekkers, 2009). Entre los elementos incrementados se encuentran colágenos I, III, V, fibronectina, tenascina, laminina y laminina (Kluijver, 2005; Roberts, 2002; Araujo, 2008; Howart, 2004; Burgess, 2009).

1.6 Laminina

Las lamininas forman parte de una familia de glicoproteínas heterotriméricas que, junto con la colágena IV, son los componentes estructurales más abundantes de la MB. La laminina está compuesta por una subunidad o cadena LN α , una LN β y una LN γ , las cuales presentan distintas isoformas como resultado de la expresión de distintos genes (Fig. 5a y b). Hasta la fecha se conocen 5 isoformas para la cadena LN α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$), 3 isoformas para la cadena LN β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) y 3 para LN γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$). La estructura del trímero de laminina dependerá directamente de las cadenas que lo forman, sin embargo, no todas las combinaciones son posibles y en humanos, y ratones sólo se han encontrado 16 lamininas distintas (Cuadro 1), las cuales, estructuralmente forman 3 grupos: en forma de “cruz”, de “y” o en forma de “soga” (Fig. 5c) (Hamill, 2009; Aumailley, 2005; Yurchenco, 2004).

El primer trímero de laminina fue descubierto en 1979 y con el descubrimiento de más trímeros fue necesario implementar una nomenclatura. La primera nomenclatura fue basada en el orden de descubrimiento, sin embargo, recientemente se comienza a usar una nomenclatura basada en las isoformas de las cadenas que componen el trímero (cuadro 1), por lo que resulta más informativa (Aumailley, 2005; Burgeson 1994).

A pesar de las diferencias en las isoformas, las cadenas comparten dominios conservados o estructuralmente relacionados entre sí. De manera general, los dominios en el **N-terminal** (Fig. 5a) de las cadenas de laminina están involucradas principalmente en interacciones con otras lamininas y moléculas de la MB y MEC, principalmente nidógeno, perlecano, agrina y colágenos IV y VII (Hamill, 2009; Yurchenco, 2017).

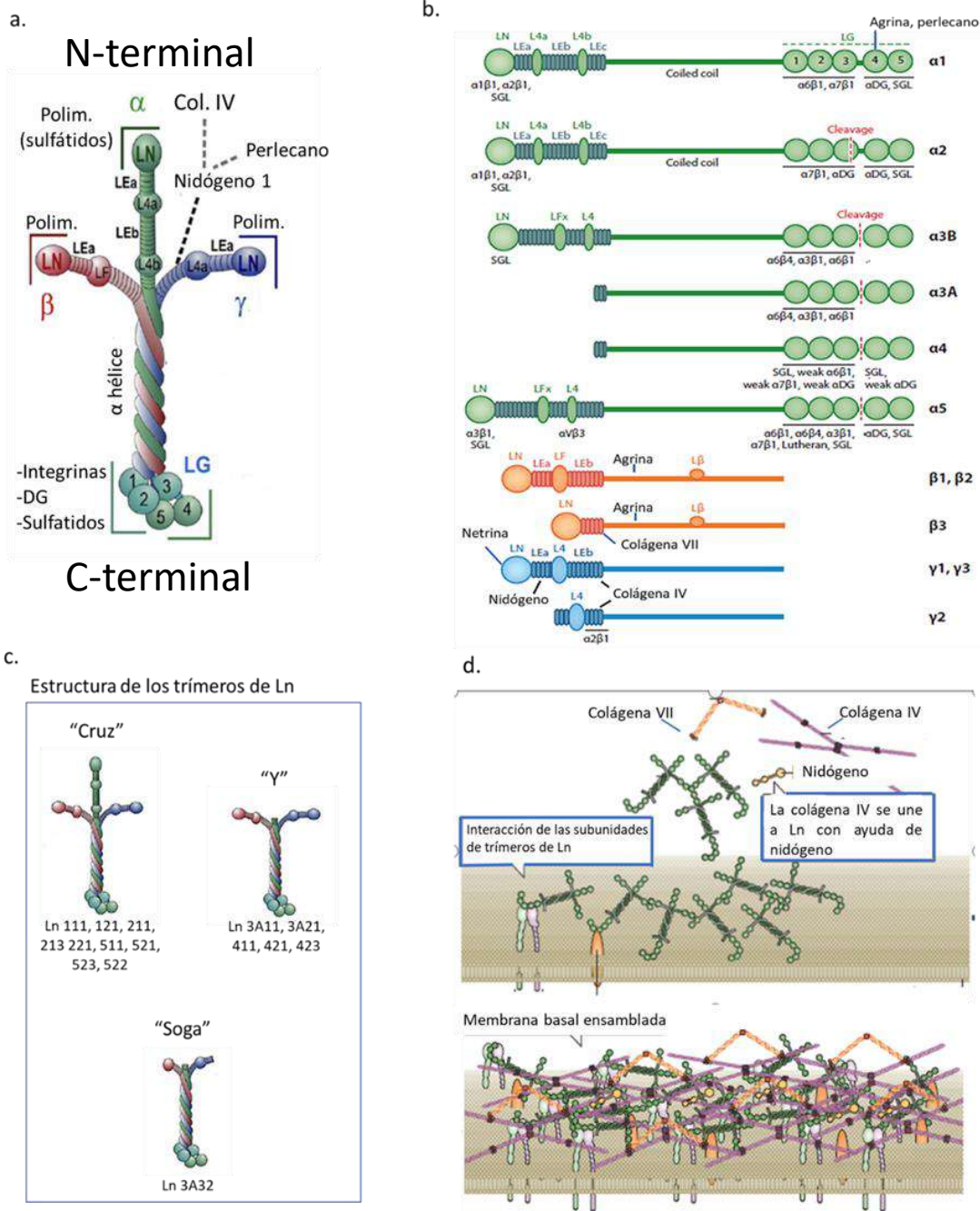


Figura 5. Heterotrimeros de laminina. **a.** La lamina forma heterotrimeros con dominios conservados en todas las lamininas. Los dominios LN también llamados dominios de polimerización, son sitios que permiten a la molécula unirse a proteínas de la membrana basal y a receptores celulares. Los dominios LE separan a dominios de mayor tamaño pero también pueden unirse a colágena IV y perlecano a través del nidogeno. Finalmente, los dominios LG son dominios globulares que, generalmente, se unen a receptores celulares **b.** Las cadenas de laminina tienen isoformas distintas; hasta la fecha se han registrado cinco isoformas distintas de α ($\alpha 3A$ y $\alpha 3B$ son resultado de splicing), mientras que las subunidades β y γ tienen 3 isoformas. Por separado cada cadena tiene afinidad a unirse a distintas proteínas de membrana basal o receptores en las células. **c.** Las cadenas de laminina se combinan formando 16 distintos trímeros, la estructura de éste dependerá de las cadenas que lo conformen, algunas lamininas pierden la forma de cruz, con ello también se modifica las propiedades de unión. En la imagen se muestra la estructura a la que corresponden los trímeros según las cadenas que posea. **d.** La Ln es esencial para iniciar el proceso de formación de la MB. Modificado de Hamill, J. *J Cell and Mol Biol.* 2009; 12: 4409- 4417 & Yurchenco, P. *Elsevier.* 2015; 76: 1- 30.

Cuadro 1 Nomenclatura y composición de los heterotrímeros		
Nomenclatura 1994	Composición de subunidades	Nomenclatura actual
Laminina 1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Ln 111
Laminina 2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Ln 211
Laminina 3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Ln 121
Laminina 4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Ln 221
Laminina 5 ó 5A	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Ln 332 ó 3A32
Laminina 5B	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Ln 3B32
Laminina 6 ó 6A	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Ln 311 ó 3A11
Laminina 7 ó 7A	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Ln 321 ó 3A21
Laminina 8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Ln 411
Laminina 9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Ln 421
Laminina 10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Ln 511
Laminina 11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Ln 521
Laminina 12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Ln 213
Laminina 14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Ln 423
	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	Ln 522
Laminina 15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Ln 523

Cuadro 1. Nomenclatura y composición de los heterotrímeros de laminina. A la izquierda se muestra la nomenclatura propuesta en 1994; esta nomenclatura se sigue usando actualmente. En la columna central se muestra la composición de isoformas correspondiente a la primera y última nomenclatura propuesta en 2015. La nomenclatura propuesta actualmente consta de 3 dígitos; el primer número indica la isoforma de la cadena α y, por lo tanto, puede tomar números de 1 a 5, el segundo número se refiere a la isoforma de la cadena β y, finalmente, el último número indica la isoforma de la cadena γ . De esta manera, el trímero Ln 111, está formado por las cadenas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. Tomado de Aumailley. Elsevier. 2005; 326- 332

La interacción de laminina con otros elementos de la MB tiene un papel fundamental, ya que la formación de la MB inicia con la liberación de laminina en la superficie celular, que posteriormente se une colágena IV mediante nidógeno y con ello se inicia la unión de otras moléculas. La inclusión de distintas isoformas de las cadenas de laminina en el inicio de la formación de la MB provee diversas propiedades específicas en la MB formada (Fig. 5d) (Yuchenco, 2017; Mouw, 2014).

En la región N-terminal de laminina se encuentran distintos dominios estructurales que pueden, o no, estar presentes en las cadenas de laminina. Los dominios LN (ausentes en LN $\alpha 3\beta$, $\alpha 4$, $\beta 3$ y $\gamma 3$) están separados por repeticiones seriadas de factor de crecimiento epidérmico tipo laminina, llamados dominios LE (por *laminin-type epidermal growth factor-like*), estos dominios están presentes en todas las isoformas de laminina y su secuencia de 60 aminoácidos ha mostrado tener homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por *epidermal growth factor*), difiriendo sólo en 8 residuos; además de brindar separación física entre dominios de mayor tamaño con

distintas actividades biológicas, los sitios LE proveen de cierto grado de flexibilidad al trímero (Sasaki, 2004; Aumailley, 1998; Domogatskaya, 2012; Cognato, 2000).

Las repeticiones LE son periódicamente interrumpidas por dominios L4 en todas las cadenas de LN α y γ , y por dominios LF en isoformas LN β 1 y β 2 (Fig. 5b) (Beck, 1990; Hamill, 2009; Aumailley, 2005; Domogatskaya, 2012).

Tomando en cuenta el número de dominios LN totales en un trímero, las lamininas se clasifican en lamininas polimerizantes, debido a que forman uniones con otros trímeros, y no-polimerizantes. Las lamininas polimerizantes estructuralmente se caracterizan por poseer tres dominios LN, uno por cada cadena, mientras que las no-polimerizantes carecen de dominios LN (Fig. 6) (Pozzi, 2017; Yurchenco 2015). Además de esta clasificación, las lamininas son divididas con base en el repertorio de interacciones, generalmente dadas en el dominio C-terminal del trímero, con receptores celulares (Fig. 6) (Pozzi, 2017; Yurchenco 2015).

Los dominios **C-terminal**, generalmente, son los sitios donde las lamininas se unen a receptores en la membrana celular como glicolípidos sulfatados (SGL, por *sulfated glycolipids*), DG e integrinas. En el dominio C-terminal las repeticiones LE son seguidas de un dominio α -hélice, que se une con otras subunidades formando una estructura helicoidal. En todas las cadenas LN β , el dominio α -hélice contiene un conjunto de aminoácidos que forman una estructura llamada nudo- β . Finalmente, los dominios globulares LG (LG1 a LG5) son exclusivos de las cadenas LN α , pueden ser o no procesados proteolíticamente (Fig. 5b), las consecuencias de dichos procesamientos aún son poco entendidos. Aunque los dominios LG son sitios que con mayor frecuencia interactúan con receptores celulares se ha demostrado que, las lamininas que se unen por medio de los sitios LG1-LG3, también requieren de las cadenas LN β y LN γ para la correcta interacción (Hamill, 2009; Aumailley, 2005; Schéele, 2007; Ido, 2007; Sun, 2016; Pozzi, 2017; Engler, 2006).

Las lamininas son los principales mediadores de señales bioquímicas y biomecánicas entre la célula y la MB. El tipo de señales enviadas dependen del trímero de laminina y al receptor al que esté unido (Fig. 7), la mayoría de las uniones a receptores involucran

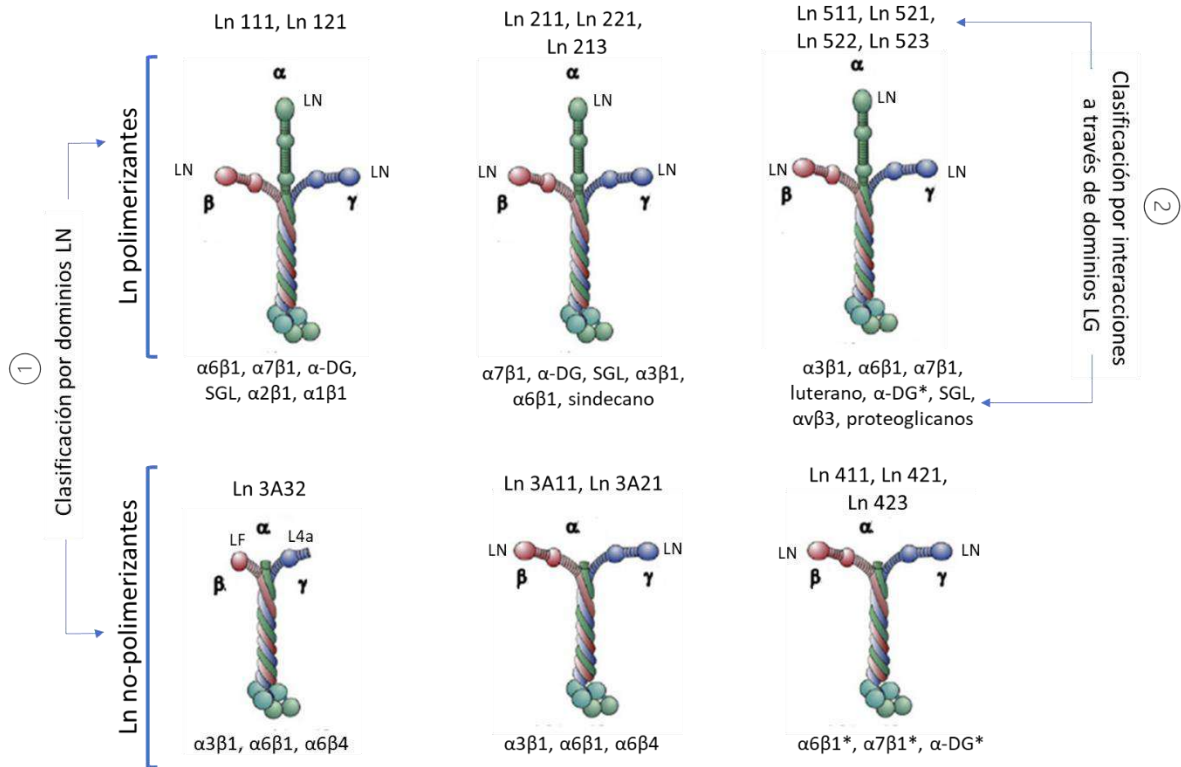


Figura 6. Clasificación de las lamininas. ①. Las lamininas pueden clasificarse como polimerizantes y no-polimerizantes según la estructura del trímero. Las lamininas polimerizantes tienen mínimo 3 dominios LN. ②. Una subdivisión de la clasificación es dada por las interacciones que tiene el trímero a través de los dominios LG. En la imagen se muestran las estructuras de las lamininas y las uniones que tiene con otras moléculas, tanto de MB como con receptores celulares. LN representa el dominio de polimerización; *unión con baja afinidad; DG, distroglicano, SLG, glicolípidos sulfatados; α, β, γ , integrinas. Modificado de Yurchenco, P. Elsevier. 2015; 76: 1- 30 & Schéele, S. J Mol Med. 2007; 85: 825- 836.

el anclaje con el citoesqueleto, pero no ocurre con todas las lamininas (Yamada, 2015; Yurchenco, 2015; Pozzi, 2017). Por ejemplo, la unión de laminina (por su dominio LG4) con SGL no involucra al citoesqueleto, sin embargo, permite la acumulación de ciertas lamininas en la superficie celular que facilita e indica que las células son “competentes” para la formación de MB, permitiendo la unión de moléculas para su ensamblaje (Li, 2005; Yurchenco, 2015).

El anclaje entre la laminina y el citoesqueleto es mediado por dos principales receptores en la membrana celular: α -DG e integrinas. El receptor α -DG tiene un dominio citoplasmático que se une a 3 partes fundamentales del citoesqueleto: a filamentos de actina (mediante complejos distrofina/utrofina), a microtúbulos (por anquirina) (Fig. 7a), y a filamentos intermedios (queratina) por plectina (Fig. 7d).

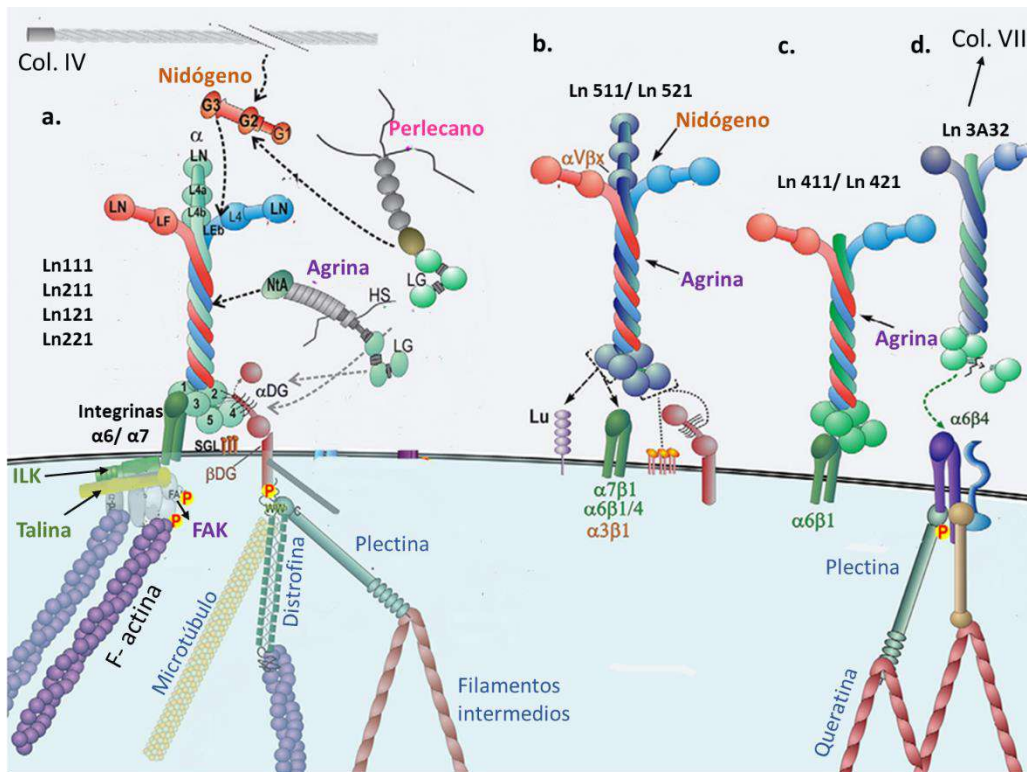


Figura 7. Interacción laminina - célula. La imagen muestra las interacciones de laminina con distintos receptores celulares como integrinas y distroglicano (DG), así como la unión con otras proteínas de membrana basal como nidógeno, perlecano, y colágenas. **a.** Interacción de laminina con integrinas y DG. Esta unión generalmente involucra la unión con el citoesqueleto, que regula funciones celulares como migración, proliferación, diferenciación y contracción. **b.** La Ln 511/ 521 son las únicas Ln que se unen a luterano (Lu) y moderadamente a-DG. Se ha encontrado que esta unión regula la diferenciación en epitelio y músculo liso en el riñón. **c.** Ln 411/ 421 se une con poca afinidad a integrinas, pero su presencia es importante en uniones neuromusculares. **d.** Ln 332 es un trímero expresado en epitelios, forma uniones con integrinas que intracelularmente se unen a queratina, en membrana basal se unen con colágenas VII. Estas uniones son muy fuertes y dan estabilidad a las células por ello se encuentra en tejidos que están sometidos a estrés físico. Lu: luterano, FAK: cinasa de adhesiones focales, ILK: cinasa ligada a integrinas, DG: distroglicano, SGL: glicolípidos sulfatados, HS: heparan sulfato. Modificado de Pozzi, A. et al. *Matrix Biol.* 2017; 58: 1- 11.

La función de estas uniones no está bien determinada, pero, la interacción α -DG-laminina promueve la polimerización de laminina para iniciar la formación de MB, pero sólo en células de Schwann y músculo esquelético; en este último se cree que confiere estabilidad estructural al sarcolema durante la contracción (Yurchenco, 2011; Yamada, 2015; Moore, 2010; Belanto 2014).

La unión de laminina con integrinas estimula la formación de complejos de adhesión, por lo que pueden regular señales mecánicas y químicas, mediante el rearrreglo del citoesqueleto (Hynes, 2002). Las señales mecánicas son, generalmente, mediadas por α -actinina, vinculina, talina, etc. Las señales químicas son mediadas por FAK que regula cascadas de señalización que activan enzimas, GTPasas y cinasas (Geiger,

2011; Harburger, 2009; Evans, 2009; Yamada, 2015). Las funciones de la unión laminina- integrina promueven la migración de ciertas células, por ejemplo, muchos leucocitos expresan integrinas para lamininas específicas que facilitan su migración a los sitios de inflamación, su proliferación, activación y supervivencia (Cuadro 2) (Simon, 2017; Hynes, 2009).

Adicionalmente las lamininas, mediante integrinas, son potentes activadores de señalizaciones AKT (por *serine/ threonine-specific protein kinase*) por lo que promueven la supervivencia celular, pero tienen baja capacidad de activar la vía de MAPK (por *mitogen- activated protein kinase*) por lo que no inducen la proliferación celular (Gu, 2002; Yamada, 2015). Por otro lado, aunque por sí misma la laminina no induce la proliferación celular, algunos trímeros (Ln 111, Ln 211, Ln 332, Ln 411, Ln 421, Ln 521 y Ln 511) tienen sitios de unión a factores de crecimiento, almacenando y regulando la disponibilidad de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y quimiocina CXCL12 γ (Ishihara, 2018).

Además, se ha demostrado que los dominios LE pueden ser presentados como ligandos solubles capaces de unirse a EGFR (receptor de EGF) y modular la

Cuadro 2 Regulación de células del sistema inmune por Ln			
Célula inmune	Lamininas	Receptores	Efectos
Neutrófilos	Ln 111, Ln 332, Ln 411, Ln 511	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, migración, incremento de TNF- α , lisozima, producción de peróxido
Basófilos	Ln 111	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión
Eosinófilos	Ln 111	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, incremento en la viabilidad, activación reducida y degranulación
Células cebadas	Ln 332, Ln 511	Integrinas $\alpha6\beta1$, $\alpha3\beta1$	Adhesión, migración, incremento en la producción de IL-8
Macrófagos	Ln 111, Ln 511	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, incremento en la producción de MMP-9, producción de TNF- α , incremento en la actividad fagocítica
Monocitos	Ln 111, Ln 411, Ln 511	Integrinas $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta2$	Adhesión, migración, incremento en la producción de TNF- α , IL-1, IL- 6, MMP-9 y función fagocítica
Células dendríticas	Ln 511	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, migración, incremento de la función fagocítica
Linfocitos B	Ln 511	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, migración, supervivencia
Linfocitos T	Ln 111, Ln 411, Ln 511	Integrina $\alpha6\beta1$	Adhesión, migración, activación, proliferación

Cuadro 2. Regulación de las funciones de células inmunológicas por distintos trímeros de laminina. Algunos trímeros específicos de laminina pueden facilitar la migración de células del sistema inmunológico, además de regular su función. TNF: factor de necrosis tumoral, IL: interleucina, MMP: metaloproteinasas de matriz. Tomado de Simon, T., et al. *Trends Immunol.* 2017; 38 (11): 858- 871.

señalización. Se cree que estos fragmentos pueden ser liberados por proteólisis, por ejemplo, ocasionada por daño o la acción de MMPs (Hynes, 2009; Schenk, 2003).

1.6.1 Funciones de la laminina

Los trímeros de laminina regulan gran número de funciones. Si las células responden de forma distinta a las cadenas monoméricas de laminina que, a los trímeros, aún es poco estudiado, pero hay evidencia de que una sola cadena de laminina regula procesos específicos, por ejemplo, las isoformas LN $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 2$ regulan la alineación física en uniones neuromusculares en fibras musculares; particularmente LN $\beta 2$ es la única laminina que se une a canales de Ca^{2+} (Pozzi, 2017; Nishimune, 2004; Vezina, 2017). Otros estudios que resaltan la importancia que tienen los monómeros de laminina son aquellos que reportan que los cambios o incrementos en una sola cadena de laminina lleva a condiciones patológicas. Por ejemplo, en esclerosis múltiple hay un cambio de LN $\beta 1$ por LN $\beta 2$ que promueve fenotipos proliferativos y migratorios en las células de músculo liso vascular (Di Russo, 2017; Fujita, 2005; Ljubimova, 2004). Finalmente, se han encontrado incrementos de LN $\beta 1$ y LN $\gamma 2$ en tumores avanzados y propensos a ser metastásicos (Yamamoto, 2009; Garg, 2014; Khazenzon, 2003; Nagato, 2005).

1.6.2 Laminina en el pulmón

Las lamininas se distribuyen ampliamente en las MB de todos los tejidos, pero la distribución y expresión de las distintas isoformas es exclusiva del tejido y del estado en el que se encuentre, ya sea durante el desarrollo, adulto o reparación, pudiéndose co-localizar más de un tipo de trímero de laminina en la misma MB (Colognato, 2000; Balestrini, 2015).

En el pulmón las lamininas se distribuyen ampliamente a lo largo de las vías aéreas y componentes del sistema circulatorio intrapulmonar (arterias, venas, capilares, etc.)

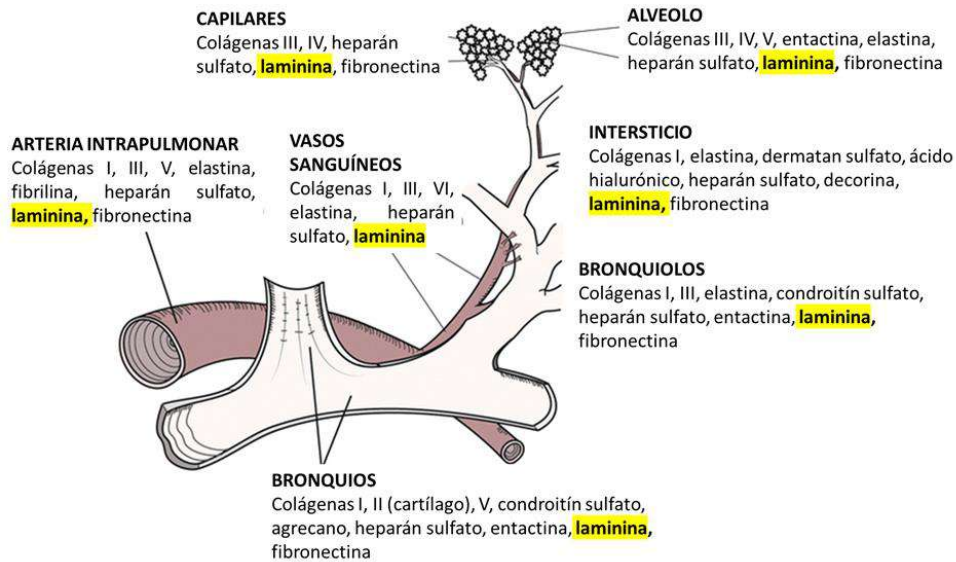


Figura 8. Distribución de laminina en el pulmón. La Ln se expresa a lo largo de las vías aéreas y en estructuras del sistema circulatorio intrapulmonar. Aunque se encuentra constantemente a lo largo de la vía aérea, la expresión exacta de los trómeros aun es poco conocida. Modificado de Balestrini, J. et al. *Ann Biomed Eng.* 2015; 43 (3): 568- 576

(Fig. 8). A excepción del desarrollo, poco se sabe sobre las isoformas de laminina que son expresadas en el pulmón adulto y su posible función (Teoh, 2013; Balestrini, 2015).

Las isoformas de laminina que se expresan durante el desarrollo del pulmón y los estudios del pulmón de ratones *knock out* para algunas de las cadenas de laminina, han brindado información sobre las funciones que desempeñan en las células durante el desarrollo, lo que permite predecir algunas de las posibles funciones que tienen en el pulmón adulto (Nguyen, 2006).

La expresión de las isoformas LN $\alpha 1$, LN $\alpha 5$, LN $\beta 1$ y LN $\gamma 1$ son esenciales para la formación del pulmón, permaneciendo LN $\alpha 1$ restringida al desarrollo, tanto en humanos como en ratones. Por otro lado, los modelos *knock out* para las isoformas LN $\alpha 2$, LN $\alpha 3$, LN $\alpha 4$, LN $\beta 2$, LN $\gamma 2$ no mostraron cambios ni alteraciones durante la formación del pulmón; sin embargo, la expresión de dichas cadenas sugiere que tienen un papel importante durante el desarrollo (Pierce, 2000; Minner, 1997; Virtanen, 1996; Durbeej, 2010; Nguyen, 2005; Nguyen, 2002; Schuger, 1991; Schuger, 1997; Booth, 2012; Willem, 2002).

La expresión de las isoformas de laminina en el pulmón adulto está poco caracterizada. En ratones, se han localizado las isoformas LN $\alpha 5$ y LN $\alpha 4$ por inmunolocalización y,

por presencia de mRNA se han encontrado todas las isoformas a excepción de LN α 1 y LN β 1 (Minner, 2004; Burgastaller, 2017); mientras que en el pulmón de humanos adultos se expresan todas las isoformas de laminina, excepto LN α 1 y LN γ 3 (Booth, 2012; Pierce, 2000; Tran, 2006).

La función de la laminina en el pulmón también es poco conocida, los estudios dirigidos a conocer sus posibles funciones muestran que tienen funciones importantes principalmente en el MLVA. En cultivos celulares, la presencia de LN α 1 mantiene la organización del MLVA, además la aplicación exógena de Ln 111 induce y mantiene fenotipos contráctiles en dichas células (Schuger, 1997; Dekkers, 2007; Hirts, 2000). Como la LN α 1, la LN α 2 también regula a las células del MLVA; esta cadena regula la diferenciación de células mesenquimales a MLVA al regular la expresión de RhoA (cinasa de la familia Ras). De forma endógena la Ln 211 induce la maduración, supervivencia y es indispensable para la contracción del MLVA (Beqaj, 2002; Relan, 1999; Tran, 2006; Dekkers, 2009; Tran, 2013).

Por la doble función que tienen la laminina, estructurales en la MB e inductoras de señales por su unión a receptores celulares, la alteración en la expresión de cadenas individuales de laminina podría modificar funciones específicas en las células (Yamada, 2015).

1.6.3 Alteraciones patológicas de la expresión de laminina en las vías aéreas

El incremento de la expresión de laminina en la vía aérea ha sido observado en condiciones patológicas que tienen como principal característica la inflamación y remodelación. Este incremento produce un mayor número de interacciones de laminina con sus receptores, modificando las respuestas mecánicas de la vía aérea, principalmente porque se incrementa la rigidez de la MB y la fuerza que ejerce sobre la célula, lo que contribuye con los procesos patológicos (Pozzi, 2017; Yurchenco, 2011; Shi, 2003; Hu, 2013).

Los pacientes con asma alérgica muestran incrementos de las isoformas LN $\alpha 1^*$, LN $\alpha 2$, LN $\alpha 3^*$, LN 5, LN $\beta 1^*$, LN $\beta 2^*$, LN $\gamma 1^*$ y LN $\gamma 2$ subepiteliales (*estas LN también se incrementaron en MB de pacientes con asma no alérgica); junto con el aumento en grosor de MB. El aumento del grosor de la MB subepitelial se relaciona con el aumento en la obstrucción de la vía aérea, que padecen estos pacientes. Aunque se ha propuesto que el incremento de estas lamininas no contribuye de manera significativa con el aumento del grosor de la MB y, que más bien, su función podría estar relacionada con mantenimiento y reparación del epitelio (Altraja, 1996; Altraja, 2008; Kawa, 2005).

Los modelos experimentales en animales han sido de gran utilidad en el estudio de la expresión de laminina durante los procesos de remodelación tisular. Por ejemplo, los ratones que presentan fibrosis pulmonar muestran decrementos en la expresión de LN $\alpha 3$, una subunidad cuya presencia también disminuye con la edad (Morales, 2015; Godin, 2016; Urich, 2011). Por el contrario, Ln 111 se incrementa en MB subepitelial, vasos sanguíneos y células inflamatorias de ratones modelo de asma (Christie, 2004).

Aunque el aumento de laminina en la MB subepitelial no se relaciona directamente con el aumento de la obstrucción de la vía aérea, el incremento de laminina en el MLVA parece estar asociado a cambios en su función al afectar sus propiedades mecánicas (Yick, 2012). La acumulación de LN $\beta 2$ en MLVA y MLVI ha sido reportada en pacientes con asma y EPOC, y en ambos casos dicha acumulación se relaciona de forma directa con la pérdida y deterioro irreversible de la función pulmonar (Kranenburg, 2006; Altraja, 1996; Yick, 2012). Adicionalmente ratones *knock out* de LN $\alpha 2$ (Lama 2^{-/-}) en un modelo de inflamación mostró que el MLVA perdía la capacidad de contraer (Tran, 2013).

1.7 Antecedentes. Modelos en cobayos sensibilizados: respondedores (R, modelo de asma) y no respondedores (NR) al reto antigénico.

El cobayo (*Cavia porcellus*) es un modelo experimental muy utilizado para el desarrollo de inflamación alérgica pulmonar (asma alérgica) ya que las respuestas inmunológicas y fisiológicas son muy similares a las observadas en humanos, inclusive, el MLVA

presenta respuestas de contracción e hiperreactividad (Ricciardolo, 2008; Taube, 2004; Kianmehr, 2016).

Para desarrollar dichas respuestas, generalmente, los cobayos son sensibilizados a un antígeno específico. Posteriormente, son expuestos al mismo antígeno, en eventos conocidos como retos antigénicos, tras los cuales, los animales sensibilizados presentan aumento en la obstrucción de la vía aérea (Fig. 9), generada por la contracción del músculo liso y/o por la secreción de moco; a estos cobayos se les conoce como animales “respondedores (R)” o modelo de asma.

Adicionalmente, los cobayos R presentan otras características del asma alérgica como inflamación mediada por linfocitos Th2, infiltración por eosinófilos e hiperreactividad de la vía aérea (Fig. 10) (Ramos-Ramírez, 2013; Bazán-Perkins, 2009).

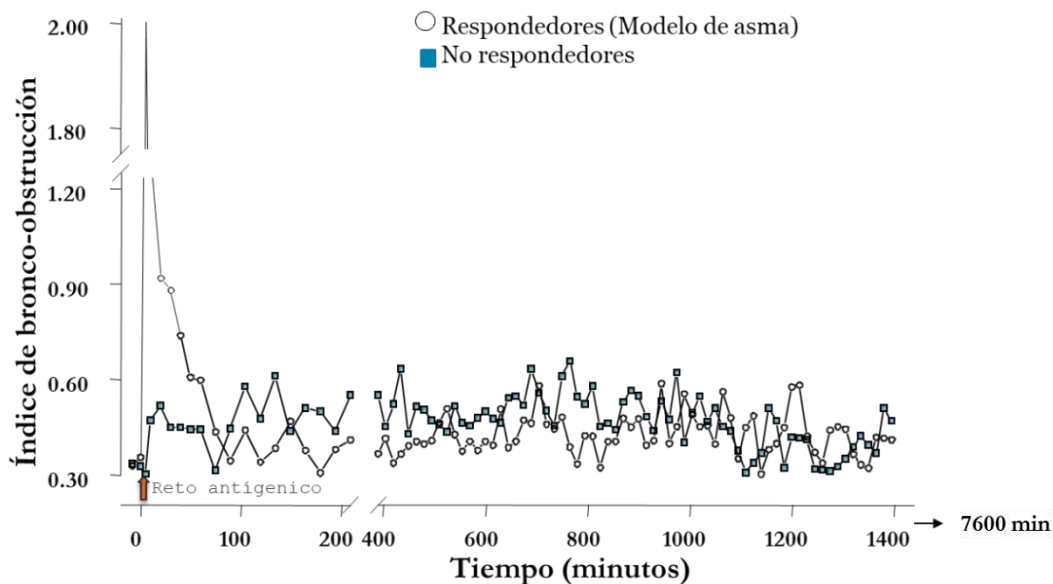


Figura 9. Respuesta bronco-obstruccion en cobayos respondedores (modelo de asma, R) y no respondedores (NR) al reto antigénico. El índice de bronco-obstrucción es una medida que permite evaluar el grado de disminución de la función pulmonar después de un reto antigénico. Cuando un cobayo es considerado como respondedor es porque el grado de obstrucción inicial (mejor conocido como “basal”) se triplica después del reto antigénico. Como se observa en la gráfica hay un grupo de cobayos que no presentan incremento en la obstrucción después del reto antigénico a pesar de estar sensibilizados; como estos animales no presentan la respuesta típica del modelo de asma se les llama “no respondedores o NR”. Tomado de Ramos, P. et al. *Exp Lung Res.* 2013; 39: 136- 145.

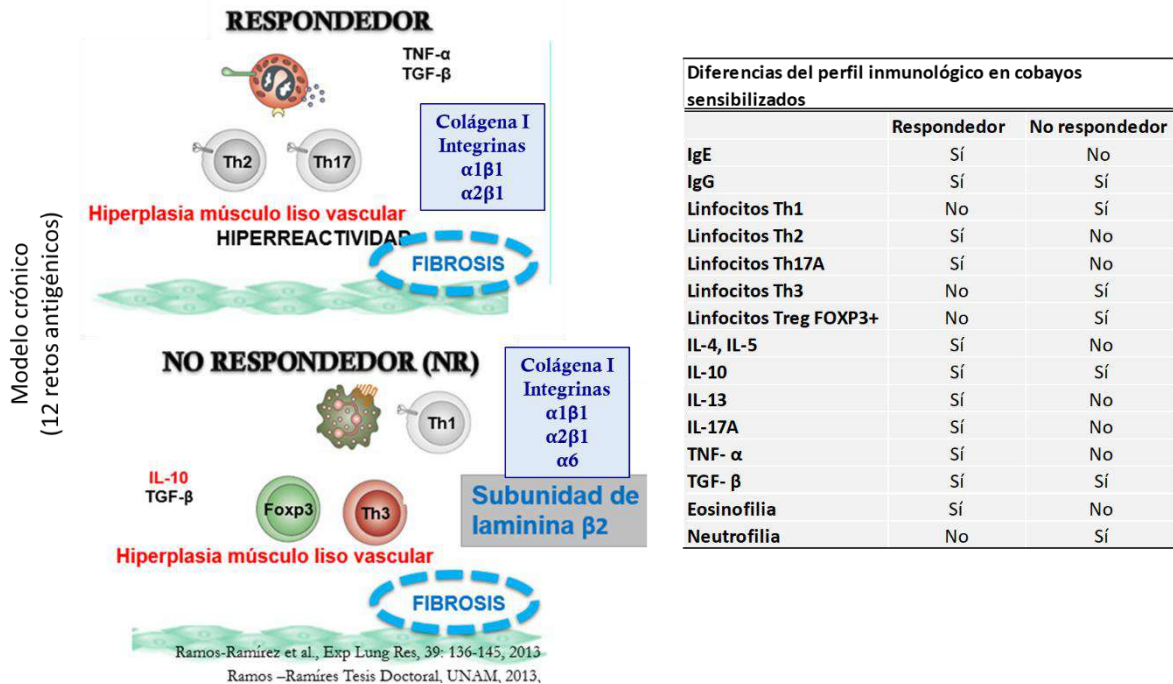


Figura 10. Características de cobayos respondedores (R o modelo de asma) y no respondedores (NR) modelo crónico. Tras ser expuestos a doce retos antigénicos los cobayos R y NR muestran distintas diferencias en las respuestas fisiológicas e inflamatorias. Las letras rojas indican los elementos compartidos en ambos modelos. Los animales R presentan infiltración de eosinófilos, linfocitos Th2, Th17 y sus respectivas citocinas. Estos animales presentan hiperreactividad de la vía aérea y desarrollan fibrosis e hiperplasia del músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). Por otro lado, los animales NR tienen infiltración de neutrófilos y linfocitos Th1, Foxp3+ y Th3. Al igual que los cobayos R, los animales NR desarrollan fibrosis e hiperplasia del MLVI, pero no tienen hiperreactividad de la vía aérea. **Cuadro perfil inmunológico.** Se muestran las diferencias en mediadores y células inflamatorias en cobayos expuestos a 12 retos de OVA. Modelo crónico. Tomado de Ramos, R. et al. *Exp Lung Res.* 2013; 39: 136- 145 & Ramos, R. Tesis Doctorado UNAM, 2013.

De manera interesante, cerca del 20% de los cobayos sensibilizados no presentan cambios en la obstrucción de la vía aérea después de los retos antigénicos, estos cobayos son llamados no respondedores (NR) (Fig. 9). A diferencia de los cobayos R, los cobayos NR no muestran incrementos de linfocitos Th2, pero presentan hiperreactividad de la vía aérea. De hecho, el perfil de células inmunológicas que presenta este grupo de cobayos está compuesto por menor presencia de células inflamatorias, como linfocitos Th1, linfocitos T reguladores y neutrófilos (Fig. 10) (Ramos, 2013a).

Tanto cobayos R como NR expuestos repetidamente al antígeno, esto es un modelo crónico con más de 6 retos antigénicos, tienen incrementos en la producción de factor de crecimiento transformante (TGF- β, por *transforming growth factor*) y desarrollan remodelación de la vía aérea, que consiste en fibrosis subepitelial (colágena I) e

hiperplasia del MLVI. Además, hay incremento en la expresión de integrinas $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$ en ambos grupos (Ramos, 2013 y 2013a; Bazán, 2009).

De manera general, los cobayos R agudos, tres retos antigénicos, y crónicos comparten prácticamente las mismas características, a excepción de la remodelación. Por otro lado, los cobayos NR agudos, al igual que los crónicos presentan gran número de neutrófilos, pero tienen diferente perfil de linfocitos T.

1.7.1 Laminina en cobayos respondedores y no respondedores al reto antigénico

En los modelos de cobayos R y NR al reto antigénico se encuentran dos tipos de músculos lisos: MLVA y MLVI, que muestran cambios funcionales después de los retos antigénicos. En los cobayos R, el MLVA presenta una respuesta hipercontráctil después de los retos antigénicos, mientras que en los cobayos NR el MLVA no presenta esta característica. Por otro lado, el MLVI, tanto en cobayos R como en NR, es hiperplásico. En un estudio previo con inmunohistoquímica se analizó la expresión por intensidad de tinción de LN $\beta2$ en los músculos lisos de los dos modelos, esperando que debido a la laminina se asocia a la contracción, su presencia fuera mayor en los cobayos con hiperreactividad. Interesantemente, los cobayos NR crónicos que no presentan obstrucción ni hiperreactividad de la vía aérea, tuvieron el mayor incremento de tinción positiva, en el MLVA de los bronquios y MLVI. Estos resultados sugirieron que, probablemente, la isoforma LN $\beta2$ no está asociada con la contracción del MLVA y su incremento esté relacionado con otra función (Pacheco-Alba, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

La laminina regula múltiples funciones bioquímicas y mecánicas en las células que la expresan. La alteración en la expresión de distintas isoformas ha sido reportada en condiciones patológicas inflamatorias, como por ejemplo el asma alérgica.

Aunque no se conoce con exactitud la función de la laminina en el pulmón, algunos estudios muestran que podría estar, principalmente, asociada a regular funciones en el músculo liso como la contracción y supervivencia (Beqaj, 2002; Relan, 1999; Tran, 2006; Dekkers, 2009; Tran, 2013; Schuger, 1997; Hirts, 2000). En apoyo a estos estudios, otros trabajos indican que la acumulación de laminina en el MLVA tiene mayores efectos fisiológicos que la acumulación de laminina en la MB subepitelial (Kranenburg, 2006; Altraja, 1996; Yick, 2012).

La expresión de LN β 2 en dos modelos de cobayos con funciones pulmonares distintas, sugirió que podría estar mediando respuestas distintas que llevan a comportamientos distintos del MLVA más allá de la contracción. Debido a la diferencia observada en LN β 2, otras isoformas de laminina podrían presentar diferencias en la intensidad de tinción o expresión (presencia-ausencia) y que, por las diferencias fisiológicas en ambos modelos, podrían estar asociadas a uno u otro modelo.

Adicionalmente, este estudio es exploratorio ya que busca aportar información sobre las isoformas de laminina presentes en cobayos condiciones normales (controles) para futuros trabajos ya la información es casi nula.

3. HIPÓTESIS

Debido a que el MLVA y el MLVI en los cobayos R y NR muestran distintas respuestas fisiológicas y estructurales, probablemente tengan una expresión diferencial de las diferentes isoformas de laminina.

4. OBJETIVOS

Evaluar la expresión de las distintas isoformas de laminina en MLVA y MLVI en cortes histológicos del pulmón de cobayos controles, R y NR al reto antigénico, mediante métodos semicuantitativos.

Objetivos particulares

- Desarrollar un modelo crónico de asma mediante la sensibilización y exposición a retos antigénicos en cobayos.
- Evaluar las respuestas bronco-obstructivas resultado de los retos antigénicos para seleccionar cobayos R y NR al reto antigénico.
- Evaluar la reactividad de la vía aérea de los cobayos, realizando curvas dosis- respuesta a histamina.
- Se tomarán muestras de lavado bronco alveolar para realizar una tinción de Romanowsky y determinar la presencia de algunos grupos de células inmunológicas en los cobayos controles, R y NR.
- Determinar la distribución de las isoformas de las cadenas de laminina presentes en cortes histológicos de pulmón mediante inmunohistoquímica (IHC) en cobayos controles, R y NR. Se incluirá la presencia de laminina en estructuras como epitelios, parénquima y mesotelio sin cuantificar.
- Medir la expresión de las distintas isoformas de las cadenas de laminina en MLVA y MLVI, a través de la intensidad de tinción generada por la IHC, usando métodos semicuantitativos, en cobayos controles, R y NR.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Para desarrollar el modelo de alergia pulmonar se trabajó con cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc: DH (Dunkin Hartley) con pesos aproximados, al inicio del protocolo, de 300 y 400 gr. Los animales permanecieron en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” en condiciones convencionales de bioterio, a una temperatura de 21 °C, aire acondicionado filtrado y ciclos de 12/12 horas de luz- oscuridad.

Las condiciones de manejo de los animales se mantuvieron apegadas a los protocolos aprobados por el Comité científico y bioético del INER (B37-12, DI/CCB/344/12).

Los cobayos, como otros modelos animales, no desarrollan asma espontáneamente, por lo que el modelo alérgico fue inducido por un antígeno. En este caso se utilizó ovoalbúmina (OVA), un alérgeno que induce inflamación pulmonar alérgica en modelos animales. El uso de OVA es común para el estudio de los mecanismos inmunológicos y no inmunológicos involucrados con el asma (Vivolo, 2017; Fuchs, 2008).

5.2 Modelo respondedor al reto antigénico (asma alérgica)

En el día 1, los cobayos fueron sensibilizados con una solución que contenía 60 µg/ml OVA y 1 mg/ml de hidróxido de aluminio diluidos en solución salina fisiológica (SSF). La solución fue administrada vía subdérmica e intraperitoneal. Ocho días después (día 8) se realizó un refuerzo antigénico administrando 1 mg/ml de OVA nebulizada durante 5 minutos. Las nebulizaciones fueron producidas con un nebulizador ultrasónico marca YueHua (flujo de 2ml/ min). Los animales control fueron nebulizados con SSF (20 ml).

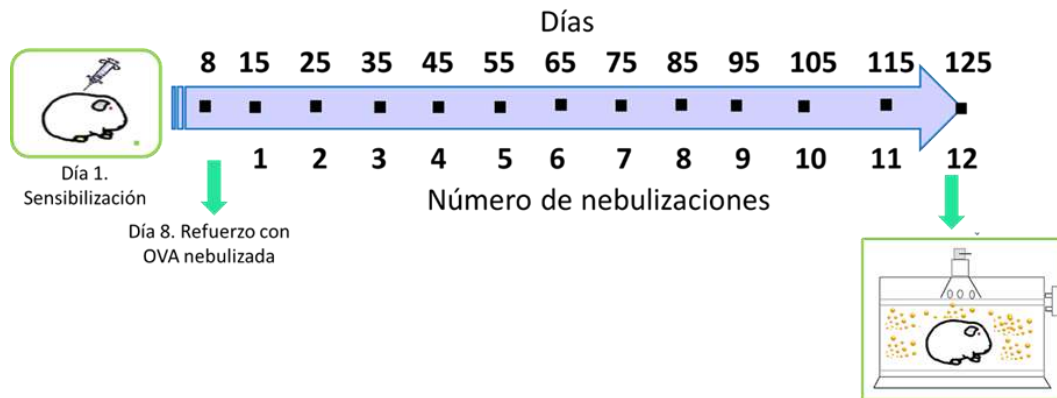


Figura 11. Modelo experimental. En el día 1 se sensibilizaron a los cobayos, 8 días después se realizó el refuerzo con OVA nebulizada por 5 minutos. Al día 15 y cada 10 días se nebulizó OVA por 1 minuto (retos antigénicos). Se hicieron un total de 12 retos (125 días).

En el día 15 posterior a la sensibilización se iniciaron retos antigénicos con OVA (0.5 mg/ml) nebulizada por un minuto; los retos antigénicos se realizaron cada 10 días durante un periodo de 125 días, completando un total de 12 nebulizaciones para desarrollar los modelos crónicos (Fig. 11). El tiempo de nebulización fue de un minuto para cada reto. Diez minutos antes y treinta minutos después de cada reto antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica.

5.2.1 Pletismografía barométrica

La pletismografía barométrica es una técnica no invasiva y altamente informativa que refleja aspectos funcionales y estructurales en enfermedades obstructivas de las vías aéreas (Criée, 2011).

Para medir la obstrucción de las vías aéreas de los cobayos se empleó un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento *BuxcoElectronics, Inc. E. U.* (Fig. 12a). El pletismógrafo cuenta con una cámara donde se coloca al animal; en esta se registran las fluctuaciones de la presión dentro de la cámara durante un ciclo respiratorio del cobayo, que inicia con la inspiración y termina con la espiración.

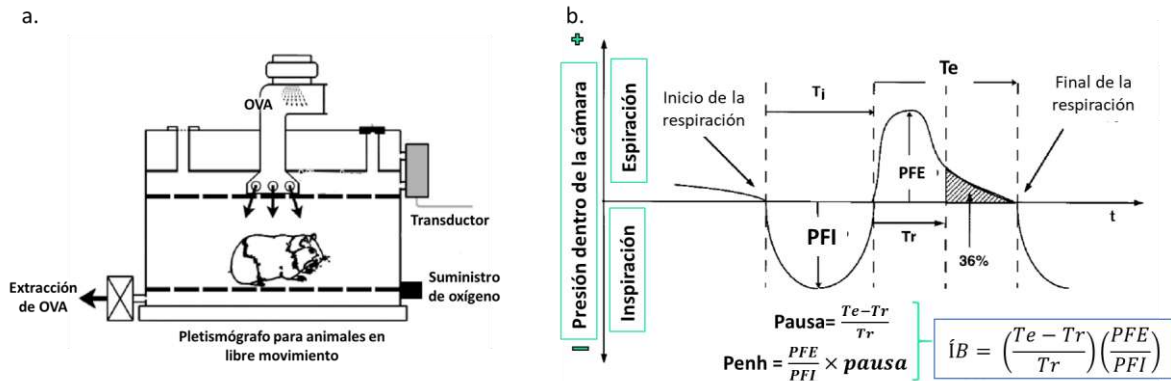


Figura 12. Pletismografía barométrica. a. Diagrama de una cámara de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. El antígeno, ovoalbúmina (OVA) es nebulizado por la parte superior de la cámara. Las fluctuaciones de la presión dentro de la cámara son registradas con un transductor conectado a una computadora. Los resultados son analizados por un software que registra los cambios y los expresa en un valor llamado Penh. La cámara cuenta con una entrada para suministrar una cantidad de oxígeno constante dentro de la cámara y una apertura para la extracción de la OVA después del tiempo de nebulización. Modificado de Zhuang, J. et al. PLOS ONE. 2019; 14 (5): 1- 19. **b. Fluctuaciones de la presión dentro del pletismógrafo durante el ciclo respiratorio de un cobayo.** Durante el proceso el pletismógrafo registra diversos parámetros respiratorios relacionados con el tiempo y la presión; el $\acute{I}B$ es calculado por el software tomando en cuenta estos parámetros. $\acute{I}B$: Índice de bronco-obstrucción, T_e : Tiempo total espiratorio (seg), T_r : Tiempo total de relajación (seg), PFE : Presión de flujo espiratorio (presión pasiva máxima, cmH2O), PFI : Presión de flujo inspiratorio (presión pasiva máxima, cmH2O). $Penh = \acute{I}B$. Modificado de Hamelmann, E. et al. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 156: 766- 775.

Durante el ciclo respiratorio se registran y miden diversos parámetros (Fig.12b). Las fluctuaciones en la presión por la respiración del animal son comparadas con una cámara de referencia (Bazán- Perkins, 2004; Hamelmann, 1997). Las señales son registradas a través de un transductor y son enviadas a un amplificador. Finalmente, la señal generada es procesada con el software *Buxco Biosystem XA v1.1* y observada en una computadora. El programa fue calibrado para registrar solamente cambios mayores a 1 ml, disminuyendo la probabilidad de registrar artefactos.

Con los parámetros registrados el software calcula el índice de bronco- obstrucción ($\acute{I}B$), una medida que expresa el grado de obstrucción que presentan las vías aéreas de los cobayos. El $\acute{I}B$ es calculado indirectamente por el software tomando en cuenta los cambios de presión en el tiempo dentro de la cámara durante el ciclo respiratorio (Fig. 12b).

De esta manera, el $\acute{I}B$ queda expresado como:

$$\acute{I}B = \left(\frac{T_e - T_r}{T_r} \right) \left(\frac{PFE}{PFI} \right)$$

Donde:

ÍB: Índice de bronco-obstrucción

Te: Tiempo total espiratorio (s)

Tr: Tiempo total de relajación (s)

PFE: Presión de flujo espiratorio (presión pasiva máxima, cmH₂O)

PFI: Presión de flujo inspiratorio (presión pasiva máxima, cmH₂O)

El ÍB fue calculado automáticamente por el software cada 5 minutos, el resultado es la media de ÍB durante este periodo de tiempo. Antes de cada reto antigénico con OVA se registraron dos valores de ÍB; como este dato es tomado antes del reto se conoce como ÍB basal.

Las fluctuaciones generadas durante la respiración de los cobayos son monitoreadas en tiempo real en la computadora (Fig. 13a), por lo que el aumento en la respuesta obstructiva en los animales R después de los retos antigénicos con OVA son fácilmente observables y distinguibles (Fig. 13b). Cuando se presentan respuestas obstructivas al reto con OVA la mayor alteración en la señal ocurre durante la espiración (PFE= presión de flujo espiratorio), este cambio tiene como consecuencia el aumento del valor del ÍB. Para considerar que un cobayo fue respondedor, el ÍB después del reto antigénico debió triplicar, como mínimo, el ÍB basal.

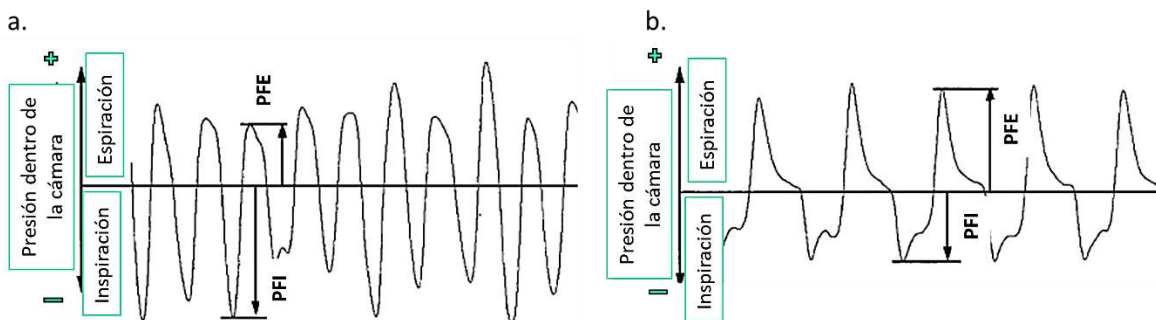


Figura 13. Cambios de presión dentro de la cámara pleto-mográfica. a. Registro de una respiración normal o basal. Este registro es observado antes del reto antigénico. **b. Registro durante la respuesta bronco-obstructiva.** Se muestra el registro obtenido cuando hay una respuesta obstructiva a la inhalación de OVA; el aumento en el PFE (presión del flujo espiratorio) resulta en aumento del ÍB). Modificado de Hamelmann, E. et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 766-775.

Con base en la respuesta al reto antigénico con OVA se seleccionaron un total de 18 cobayos que fueron divididos en 3 grupos: controles, respondedores (modelo de asma) y NR, con $n= 6$ cobayos cada uno.

5.2.2 Reactividad de las vías aéreas

Los retos con agonistas constrictores, como histamina o metacolina, son ampliamente usados para documentar y cuantificar la reactividad y la hiperreactividad en pacientes y en animales modelos de asma (Donald, 2010; O'Byrne, 2003). En este sentido, se midió la reactividad de las vías aéreas en el día 125 (12 retos antigénicos) en los cobayos control, R y NR mediante la realización de dos curvas dosis-respuesta (ÍB) de histamina.

El ÍB basal fue medido antes de iniciar la primera curva; posteriormente, la histamina fue nebulizada en concentraciones crecientes, de 0.01 a 0.32 mg/ml en SSF, durante un minuto con intervalos de 10 minutos entra cada una. Para cada concentración de histamina se midió ÍB hasta alcanzar una concentración que provocara un aumento del 200% en comparación del ÍB basal, esta dosis es conocida como “dosis provocativa 200” (DP200), por provocar una obstrucción 200% mayor al ÍB basal (Fig. 14). Terminada la primera curva se esperó a que los valores de ÍB regresaran a su estado basal. Una vez alcanzado este valor se realizó un reto antigénico a los cobayos R y NR; los cobayos controles fueron nebulizados con SSF. La segunda curva de histamina se realizó tres horas después del reto antigénico, siguiendo el mismo procedimiento de la primera curva (Fig. 14).

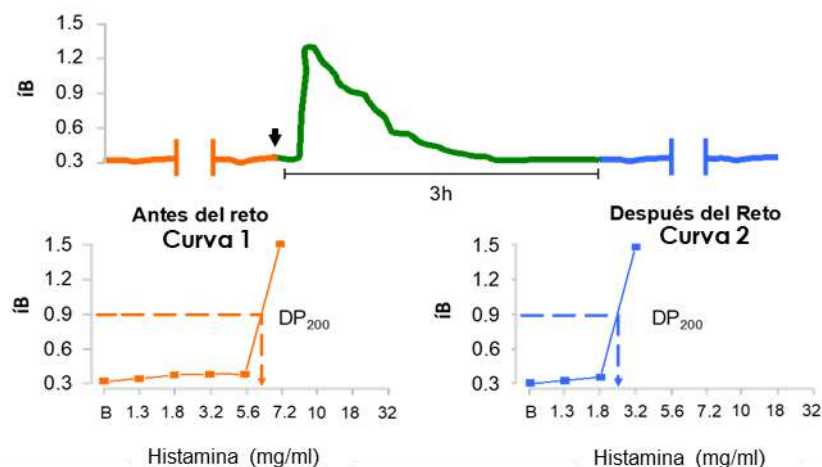


Figura 14. Curvas dosis-respuesta a histamina. Los cobayos fueron nebulizados con concentraciones crecientes de histamina ($\mu\text{g/ml}$). La primera curva de histamina (gráfica naranja) terminó cuando la concentración de histamina provocó que el cobayo triplicara su $\dot{V}B$ basal (concentración conocida como dosis provocativa 200). Una vez terminada la primera curva se nebulizó a los cobayos con OVA (línea verde), los cobayos R triplican su $\dot{V}B$ basal después del reto con OVA. Tres horas después de la OVA se procedió a la segunda curva de histamina (gráfica azul). Se considera como un animal **hiperreactor** cuando en la segunda curva de histamina se necesita una DP_{200} menor en comparación de la DP_{200} de la primera curva. Tomado de Ramos, R. et al. *Exp Lung Res.* 2013; 39: 136- 145.

5.3 Obtención de muestras

Las muestras fueron tomadas 24 horas después las curvas de histamina. Los animales fueron sobre dosificados con pentobarbital sódico (28 mg/kg) para inducir un paro cardiorrespiratorio. Para la obtención de lavado bronco-alveolar (LBA) se hizo una incisión a altura cervical para localizar la tráquea, una vez localizada se realizó un corte por el que se introdujo una cánula, a través de la cual, se introdujeron 5 ml de SSF mantenida a 37 °C, esta se mantuvo por un minuto y se procedió a su recuperación, el procedimiento se realizó por duplicado mezclando los volúmenes recuperados. Las muestras de LBA se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4 °C en una centrífuga *Hettich- Zentrifuge Universal 320R*. El sobrenadante fue almacenado, mientras que el botón celular se mantuvo en hielo.

Finalmente, los pulmones fueron almacenados en formaldehído al 10% y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina. Los bloques obtenidos, del lóbulo inferior izquierdo, fueron cortados con un grosor de 3 μm y colocados en un portaobjetos (laminillas) (*Biocare medical, Kling- On slides*. Concord USA).

5.4 Conteo celular diferencial

El botón celular restante, obtenido después de centrifugar el LBA, fue resuspendido en 1 ml de SSF. El número total de células se obtuvo tomando 10 µl del botón resuspendido y se mezclaron con 40 µl de azul de tripán (0.4% Sigma). Posteriormente, se contó el número de células usando una cámara de Neubauer. Para calcular el número de células en 1 ml de LBA, el número contabilizado en la cámara se multiplicó por el factor de dilución (5) y el factor de la cámara (10,000). El volumen celular se ajustó hasta obtener 1 000 000 de células por mililitro, adicionando SSF. De esta solución se tomaron 50 µl que fueron centrifugados a 850 rpm por 5 minutos usando una citocentrífuga para obtener un botón celular. Para poder realizar el conteo diferencial, el botón celular obtenido fue teñido con la técnica de Romanowsky. Se contaron 200 células, excluyendo eritrocitos.

5.5 Inmunohistoquímicas

La inmunohistoquímica (IHC, por *immunohistochemistry*) es una técnica que utiliza la aplicación de anticuerpos para determinar la distribución y localización de un antígeno determinado dentro de un tejido sano o enfermo.

Con los cortes obtenidos anteriormente se procedió a realizar inmunohistoquímicas para localizar las distintas isoformas de laminina en los animales controles, R y NR. Los cortes fueron desparafinados en una estufa a 55 °C durante 30 minutos, transcurrido este tiempo las laminillas se introdujeron en lavados de xilol, dos veces por 5 minutos cada una, etanol 100 %, 2 lavados por 3 minutos cada uno y finalmente en etanol 95%, etanol 70% y etanol 50% por 3 minutos, este proceso es necesario para la rehidratación del tejido. Una vez concluido el proceso de rehidratación las laminillas se lavaron en agua desionizada (diH₂O).

Los procesos de fijación e inclusión en bloques de parafina pueden alterar la conformación de las proteínas en los tejidos, por lo que fue necesario realizar

recuperación antigénica; para este fin se usó el método de recuperación de epítipo inducida por calor (HIER, por *heat-induced epitope retrieval*). Las laminillas se colocaron en un vaso coplin (resistente al calor), con buffer de citrato de sodio (10 mM, 0.05% Tween 20, pH 6) y se calentó por 5 minutos. Las laminillas fueron lavadas con buffer de solución salina con tris (tris buffered saline, TBS pH 7.6, 0.1 % Tween). Posteriormente los tejidos fueron bloqueados con 10% de suero de cabra (*Normal goat serum, ThermoFisher Scientific, US*), 0.025 % de Tween en TBS por 1 o 2 horas a temperatura ambiente. Luego se aplicó el anticuerpo primario monoclonal específico para distintas isoformas de LN (Cuadro 3) diluído en TBS con albúmina de suero bovino (1% bovine serum albumin, BSA, SIGMA) y se dejó incubar toda la noche a 4 °C.

Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena las muestras se incubaron durante 15 minutos con TBS con 3% de H₂O₂. El anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, por *horseradish peroxidase*), fue preparado a una concentración de 1: 500 de la misma forma que el anticuerpo primario (Cuadro 3) y, incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Como cromógeno y sustrato de la HRP fueron usados 150 µl de diaminobencidina (DAB, *ThermoFisher Scientific, US*) o amino etil carbazol (AEC, *VECTOR laboratories*) con H₂O₂ por laminilla.

Cuadro 3 Anticuerpos utilizados		
Ln	Anticuerpo primario	Concentración utilizada IHC Anticuerpo secundario
Subunidad de Ln α3	IgG de ratón anti- Ln α3 de humano (Invitrogen)	1 µL Ac:50
Subunidad de Ln α4	IgG de ratón anti- Ln α4 de humano (R&Dsystems)	1 µL Ac:200
Subunidad de Ln β1	IgG de ratón anti- Ln β1 de humano (abcam)	1 µL Ac:100
Subunidad de Ln β2	IgG de ratón anti- Ln β2 de humano/rata/ chicken (R&Dsystems)	1 µL Ac:100
Subunidad de Ln γ1	IgG de ratón anti- Ln γ1 de humano/Rata (R&D systems)	1 µL Ac:100
Subunidad de Ln γ2	IgG de ratón anti- Ln γ2 de humano (Invitrogen)	1 µL Ac:200
Subunidad de Ln γ3	IgG de ratón anti- Ln γ3 de humano (LSBio- LifeSpan)	1 µL Ac:100
Subunidad de Ln α5	IgG de conejo anti- Ln α5 de ratón/rata/humano (abcam)	1 µL Ac:100
Subunidad de Ln β3	IgG de conejo anti- Ln β3 de humano (abcam)	1 µL Ac:500
Subunidad de Ln α1	IgG de rata anti- Ln α1 de ratón (R&D systems)	20 µL Ac:1000
Subunidad de Ln α2	IgG de rata anti- Ln α2 de humano/ratón	8 µL Ac:1000

Para determinar que el color no se desarrollara de forma inespecífica en cada procedimiento se utilizaron, como control negativo, tejido sin anticuerpo primario pero que se sometieron a todo el protocolo. Una vez desarrollado el color, las muestras fueron lavadas con diH₂O y contra teñidas con hematoxilina (*VECTOR Hematoxylin H-3404*) y se montaron con un medio semi-permanente para IHC *EcoMount (Biocare Medical, US)*.

La ausencia o presencia de la inmunotinción fue observada en un microscopio óptico *Zeiss Axio Lab A1*. Con el programa *Zen Wide Field*; usando la cámara *axioCam ERc5s*, se tomaron micrografías a aumentos de 40X y 100X de MLVA (bronquios y bronquiolos), MLVI (venas y arterias intrapulmonares) y otras estructuras pulmonares como epitelio bronquial, parénquima y mesotelio.

5.5.1 Análisis de expresión semi- cuantitativa de laminina (expresión por intensidad de tinción)

El uso de cromógenos en la IHC permite detectar fácilmente la localización de una proteína de interés dentro de los tejidos; sin embargo, la presencia de color sólo brinda información sobre la presencia o ausencia del antígeno que se busca. Los análisis semicuantitativos son métodos que permiten estudiar la expresión de una proteína, sin cuantificarla directamente, y se basa en el hecho de que un aumento en la intensidad de la tinción producida por el cromógeno está directamente correlacionado con la cantidad de proteína expresada en el tejido en condiciones normales (Nguyen, 2013; Crowe, 2019).

Los análisis semicuantitativos involucran el uso de un software, en este caso se utilizó el programa *Image J 1.48*, que mide la intensidad de la marca de IHC de forma indirecta. Antes de realizar la cuantificación de la intensidad en los tejidos, el programa fue calibrado para medir la intensidad en una escala de grises. De forma predeterminada los pixeles en blanco, correspondientes a áreas sin tejido, tiene un valor de 255 y los pixeles negros de 0. Debido a que el programa se calibró en escala de grises las

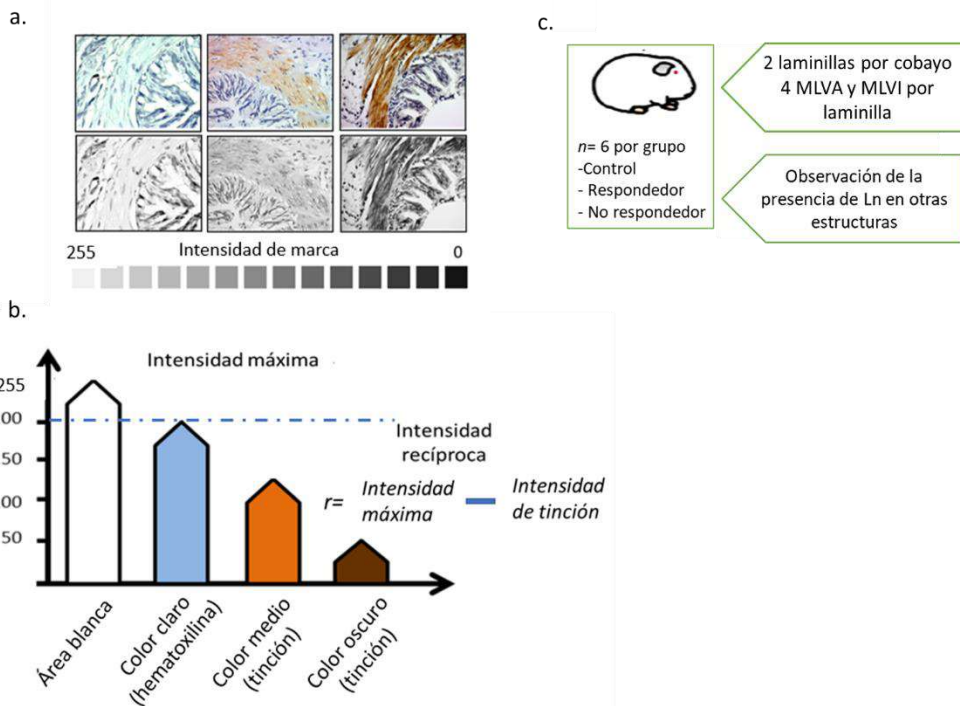


Figura 15. Análisis semi-cuantitativo de la intensidad de marca en las inmunotinciones. a) Para medir la intensidad de marca del cromógeno en los tejidos el programa Image J fue calibrado para detectar el brillo u oscuridad en una escala de grises. Se asignó una escala de valor numérico a lo largo de la escala de grises, siendo 255 para blanco y 0 para negro. **b)** Las imágenes tienen valores de brillo estándar de 255 en sitios sin tejido; la contra tinción con hematoxilina y tinciones específicas con diaminobencidina (DAB) o aminoetilcarbazol (AEC) tienen valores de intensidad variables según la cantidad de laminina presente. La cantidad de laminina oscurece los tejidos en microfotografías blanco y negro, por lo que toman valores cercanos o menores de 255; las gráficas resultantes muestran una relación inversamente proporcional al grado de tinción. Sustrayendo la intensidad de marca al valor de intensidad máxima en tejido sin tinción se obtiene la intensidad recíproca, que se correlaciona positivamente con la intensidad de la tinción. Modificado de Nguyen, D. et al. *Cancer InCytes*. 2013; 2 (1): e. **c)** De las microfotografías tomadas previamente se midió la intensidad de marca del MLVA y del MLVI, así como la presencia de laminina en otras estructuras.

micrografías tomadas anteriormente fueron convertidas a imágenes en escalas de grises para su análisis (Fig. 15a). Al analizar los tejidos el programa asignó valores intermedios entre 255 y 0 según la intensidad del color (marca del cromógeno). Las áreas contra teñidas con hematoxilina representan el valor de “intensidad máxima”, mientras que las áreas de tejido teñidas por la IHC representan el valor de “intensidad de tinción”.

Dado que, a mayor intensidad de tinción las mediciones toman valores cercanos a 0 fue necesario calcular el valor de “intensidad recíproca (r)” que se correlaciona positivamente con la intensidad de tinción, y se expresa como $r = \text{intensidad máxima} - \text{intensidad de tinción}$ (Fig. 15b) (Nguyen, 2013; Crowe, 2019).

El valor de la intensidad reciproca será referido como “intensidad de marca” o “expresión” de laminina de forma indistinta en los resultados obtenidos, cabe mencionar que esta expresión es semi cuantitativa ya que el incremento en la intensidad de tinción sólo sugiere un incremento en la expresión cuantificable de laminina. La expresión de laminina sólo fue medida en el MLVA y en el MLVI.

5.6 Análisis estadísticos

Los datos de $\% \dot{B}$ antes y después de la inhalación de OVA de cada cobayo fueron analizadas mediante prueba de t pareada ($\alpha=0.05$).

Las pruebas de respuesta máxima ($\% \dot{B}$) a la OVA (en cada reto), la hiperreactividad a histamina, el conteo celular y la intensidad de marca de laminina en el MLVA bronquial y MLVI fueron analizados con ANOVA de 1 vía, con prueba postHoc Bonferroni (comparación múltiple) $p<0.05$ como mínimo. Las barras que se muestran en las distintas distribuciones reflejan el error estándar.

6. RESULTADOS

6.1 Respuestas bronco-obstructivas a los retos antigénicos

Los cobayos sensibilizados a la OVA y fueron retados cada 10 días con el antígeno y en cada reto se obtuvo el porcentaje del ÍB máximo alcanzado después del reto en relación con el ÍB basal. De acuerdo con el porcentaje de ÍB obtenido de los cobayos fueron clasificados en dos grupos: R, si el ÍB superaba el 200% de la respuesta basal en todos los retos antigénicos, y NR si todos los ÍB fueron menores al 200% del ÍB basal. Las respuestas al reto antigénico de los cobayos R, NR y controles en relación con su respectivo ÍB basal se muestran en la figura 16 y 17.

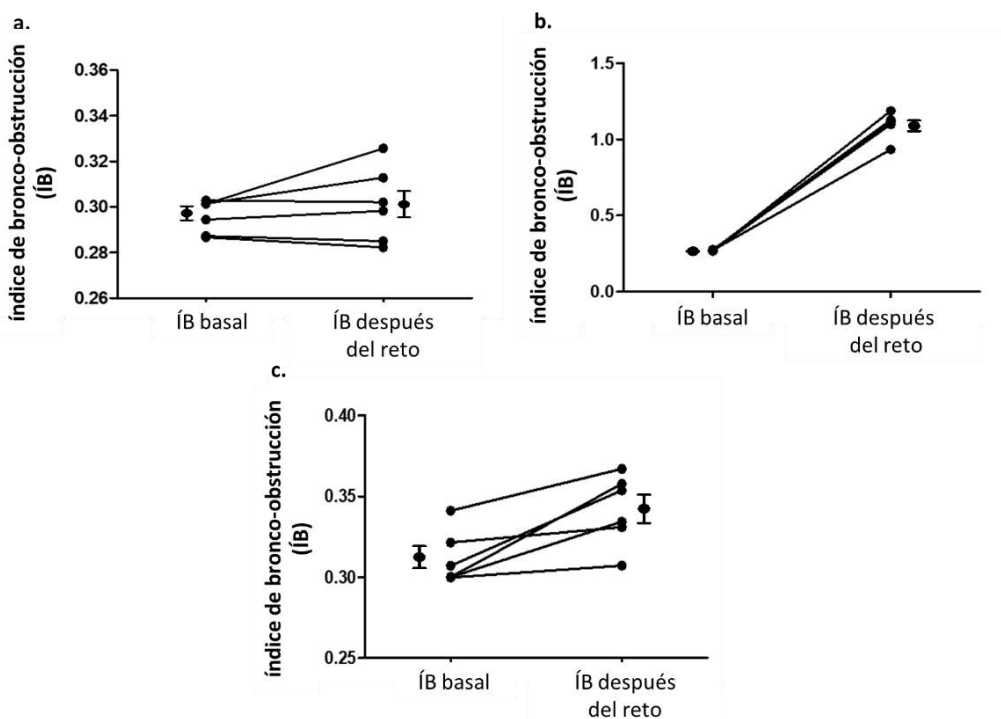


Figura 16. Respuesta obstructiva antes y después de los retos antigénicos con ovoalbúmina (OVA). Cada punto representa un cobayo y el promedio de sus ÍB basales (12 valores registrados) y posteriormente el promedio que alcanzó el ÍB después de los retos (no se muestra el error estándar por cobayo) **a. Control.** Los animales controles se expusieron a nebulizaciones de SSF. No mostraron incremento significativo en el ÍB. **b. Respondedores (R).** La obstrucción de la vía aérea aumentó de forma significativa después del reto antigénico con OVA. Análisis de t pareado $*p < 0.001$. **c. No respondedores (NR).** La respuesta obstructiva no aumentó significativamente. Las barras corresponden al error estándar. $n = 6$ cobayos por grupo.

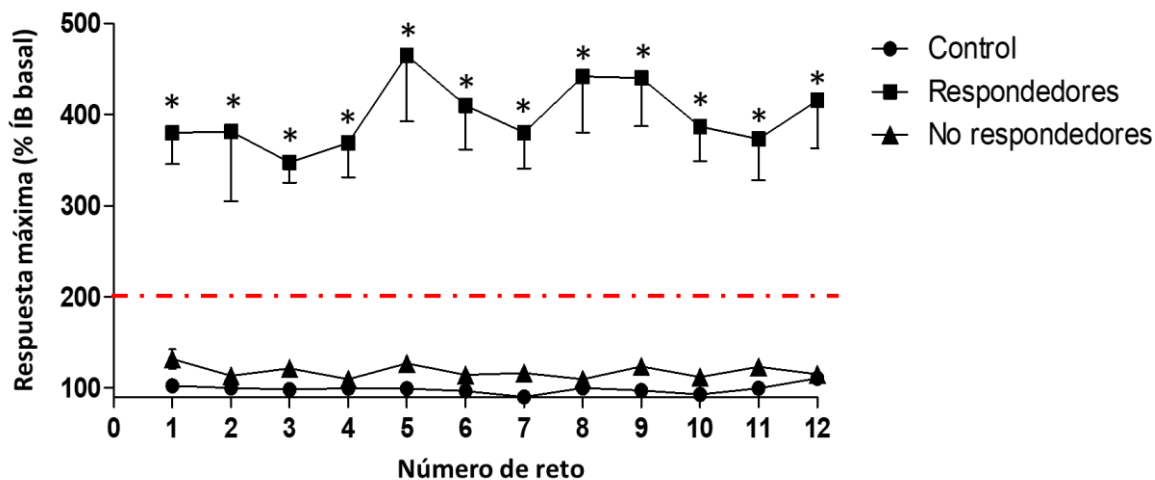


Figura 17. Respuesta bronco-obstruccion máxima alcanzadas después del reto antigénico en cobayos sensibilizados Los valores corresponden al porcentaje de respuesta máxima del índice de bronco-obstrucción (ÍB) obtenida después del reto antigénico en cobayos sensibilizados en relación al ÍB basal. Los cuadros negros representan el promedio de respuesta de 6 cobayos respondedores, clasificados. Así debido a que el porcentaje de ÍB de las respuestas de este grupo fueron mayores al 200% del ÍB basal. Por otro lado, los cobayos NR (triángulos negros) y controles (círculos negros) no presentaron aumentos significativos del ÍB después del reto antigénico o la nebulización con SSF. La línea roja representa el límite (aumento en 200% del ÍB basal) para considerar el aumento de ÍB como una respuesta obstructiva positiva provocada por la inhalación del antígeno. * $p < 0.05$. ANOVA postHoc Bonferroni. Las barras representan el error estándar. $n = 6$ cobayos por grupo.

6.2 Reactividad de las vías aéreas. Los cobayos NR crónicos no presentan hiperreactividad de la vía aérea.

La reactividad de la vía aérea en el cobayo se determina al comparar la contracción inducida por un agonista antes y después de un reto antigénico (Bazán- Perkins, 2009). Para evaluar los cambios en la reactividad de la vía aérea en los grupos R, NR y controles, en el doceavo reto antigénico se realizaron dos curvas dosis- respuesta con histamina. La primera curva se realizó antes del reto con OVA y la segunda después del reto. La administración de histamina terminó cuando el ÍB alcanzó el 200% del ÍB basal, dosis conocida como DP200.

La DP200 para los cobayos controles (Fig. 18a) y NR (Fig. 18c) no mostraron diferencias entre sí. Contrario a esto, la DP200 después del reto antigénico con OVA fue menor en

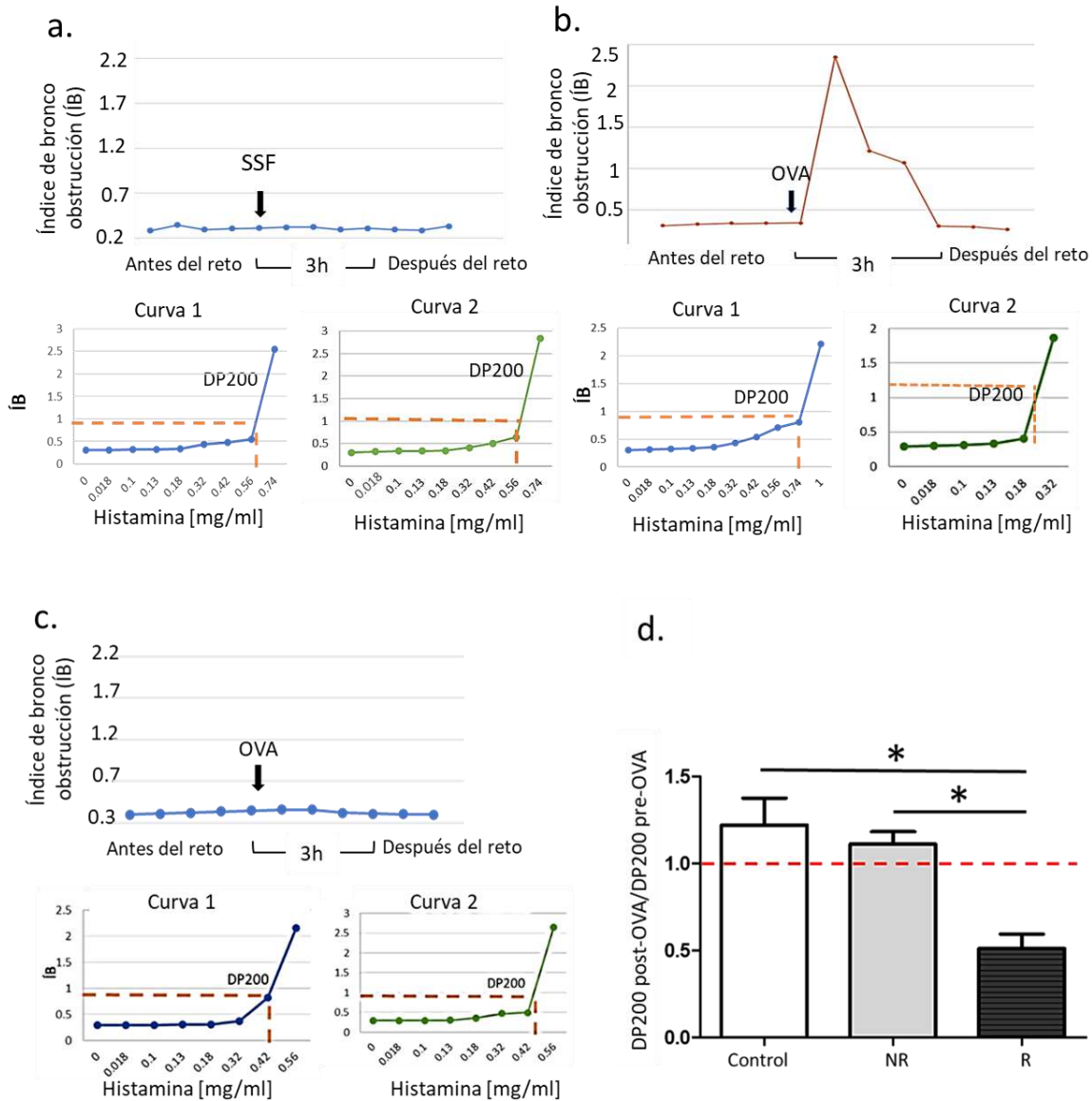


Figura 18. Reactividad de las vías aéreas de los cobayos ante curvas dosis-respuesta de histamina. La histamina fue nebulizada en dosis crecientes y se registró el IB en cada dosis. **a) Reactividad de las vías aéreas de cobayos controles.** La gráfica superior indica el cambio en el IB ante la nebulización de SSF. Debajo se muestran las gráficas de la primera y de la segunda curva de histamina. La DP200 (concentración de histamina que induce un aumento del 200% en el IB basal) de ambas curvas es muy similar. **b) Reactividad de las vías aéreas de cobayos que muestran respuesta (R) obstructiva al reto antigénico con ovoalbúmina (OVA).** La gráfica superior indica que los cobayos R tuvieron un aumento en el IB después de la exposición a OVA. Las gráficas inferiores muestran que la DP200 de histamina de la segunda curva fue menor a la de la primera curva, esto indica que los cobayos R son hiperreactores. **c) Reactividad de las vías aéreas de cobayos no respondedores al antígeno (NR).** A diferencia de los cobayos control y R los animales NR muestran un ligero incremento en el IB después de la exposición a OVA. Sin embargo, al igual que los animales control la DP200 se mantiene en ambas curvas dosis-respuesta de histamina. **d) índice DP200 Post-OVA/DP200 pre-OVA.** Según este índice los valores menores a 1 (línea roja) indican que la DP200 usada en la segunda curva fue menor a la DP200 de la primera curva. Los cobayos R tuvieron resultados por debajo de 1 lo que indica que son animales que presentan hiperreactividad. $p < 0.001$ (ANOVA de 1 vía, prueba postHoc: comparación múltiple de Bonferroni).

cobayos R (Fig.18b). Al hacer la relación DP200 post-OVA/ DP200 pre-OVA (Ramos-Ramírez, 2013), sólo los cobayos R obtuvieron valores menores a 1, lo que indica que hubo un aumento en la reactividad de las vías aéreas en este grupo, es decir, los cobayos R presentaron hiperreactividad de la vía aérea reactividad de las vías aéreas (Fig. 18d).

6.3 Células inflamatorias en los cobayos R y NR al reto antigénico

El incremento de células inflamatorias es una característica de muchas enfermedades crónicas en el pulmón que provocan remodelación. Por lo descrito previamente por Ramos- Ramírez (2013a), se sabe que los cobayos R tienen un perfil de células inflamatorias Th2, que se caracteriza por presentar gran cantidad de eosinófilos, como en el asma alérgica; mientras que los cobayos NR presentan células distintas, entre las que se encuentran linfocitos Th1, Treg y neutrófilos.

En el presente estudio se observó que el LBA de los cobayos R y NR tienen mayor número de linfocitos ($p < 0.05$) y neutrófilos ($p < 0.05$) en comparación al grupo control, mientras que el número de eosinófilos solo fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en los animales R (Fig. 19).

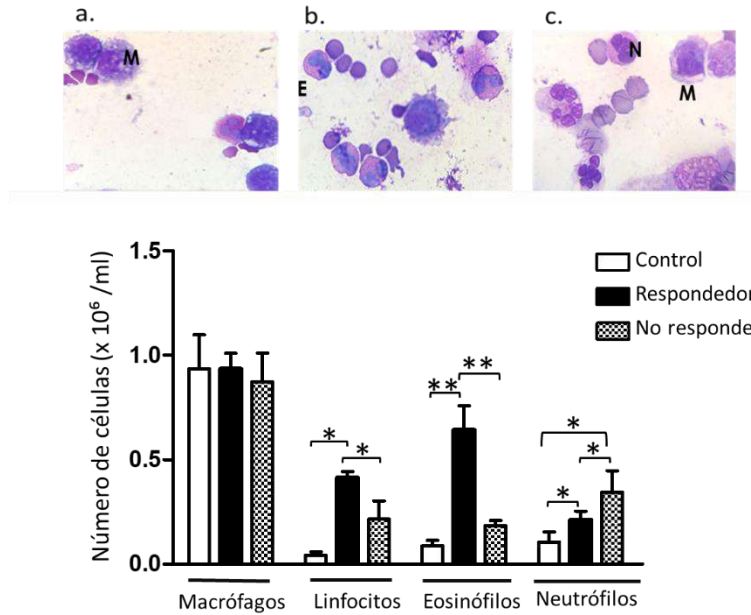


Figura 19. Conteo celular diferencial en lavado bronco-alveolar (LBA). Micrografías representativas que muestran las células con mayor presencia o características de **a)** cobayos control, **b)** cobayos respondedores (R) y **c)** cobayos no respondedores (NR) al reto antigénico. La grafica muestra las células encontradas en el LBA de los grupos estudiados. Se contabilizaron un total de 200 células por laminilla. Previamente se había realizado un botón celular con las células de LBA a una concentración de 1×10^6 /ml. ANOVA de 1 vía, prueba postHoc: comparación múltiple de Bonferroni. $n = 6$ cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, **Diferencia significativa $p < 0.001$. M: Macrófago, E: Eosinófilo, N: Neutrófilo.

6.4 Expresión de las isoformas de laminina (LN)

La laminina es una proteína heterotrimérica que puede llegar a expresarse de forma monomérica en condiciones patológicas o de reparación. El estudio de la expresión de las cadenas por separado podría sugerir qué trímeros o monómeros podrían estar expresándose, co-expresándose y sobre expresándose en los tejidos.

Para determinar la expresión de las distintas isoformas de laminina en el MLVA y MLVI se consideró la intensidad de marca, y se refiere a la tinción producida por el cromógeno por la presencia de laminina. La intensidad de marca puede tomar valores de 0 (menor marca) a 255 (marca intensa) y es directamente proporcional a los cambios en la tinción de laminina observados, ya que se basa en el hecho de que la intensidad de la tinción producida por el cromógeno está relacionada a la cantidad de proteína expresada en el tejido (Nguyen, 2013; Crowe, 2019); por este motivo al hablar de “expresión” de

laminina se referirá a la expresión semi cuantitativa llamada, intensidad de marca y viceversa.

Adicionalmente, se identificó la presencia de laminina en otras estructuras como parénquima (alveolos), epitelio de la vía aérea y mesotelio; en estos la presencia de laminina se referirá como “Inmunolocalización de laminina” ya que no se realizaron análisis cuantitativos. La presencia de laminina en las micrografías tomadas se observa en tinciones con coloraciones rosa a rojo, para AEC, y de café claro a café oscuro, para DAB, en caso de que la tinción sea difícil de percibir se señaló con flechas.

6.4.1 Isoforma LN α 1

La expresión de LN α 1 se localizó en el MLVA y MLVI de todos los grupos (color rojo/rosa), aunque la inmunotinción fue distinta entre los grupos. En MLVA y MLVI de cobayos R, el área ocupada por LN α 1 es más homogénea a la que se observa en los cobayos NR y controles, donde la marca es más aislada en MLVA y, en MLVI la presencia de LN α 1 forma franjas aisladas distribuidas por todo el músculo (Fig. 20a).

Visualmente, la LN α 1 presentó una mayor tinción el MLVA y MLVI de los cobayos R, mientras que, la tinción observada en el MLVA y el MLVI de los cobayos NR y controles fue muy similar entre sí (Fig. 20a). El análisis de la intensidad de tinción confirmó que el aumento en la intensidad de marca, y por tanto de la expresión de LN α 1, observado en los cobayos R tuvo un aumento significativo ($p < 0.01$) en comparación con los grupos controles y NR, tanto para el MLVA como para el MLVI, los cuales presentaron expresión de LN α 1 similares (Fig. 20b).

Otras estructuras donde se encontró presencia de laminina fueron, el epitelio y el parénquima de todos los grupos. De forma visual, se aprecia un incremento en la tinción de estas estructuras en los animales R en comparación a los otros grupos (Fig. 21).

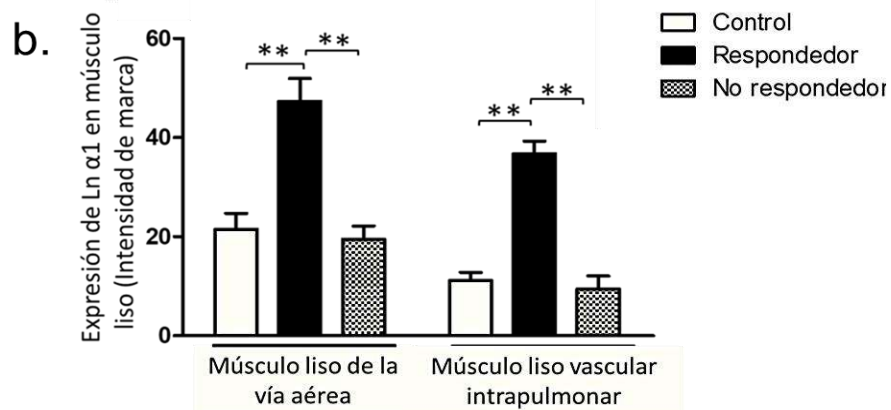
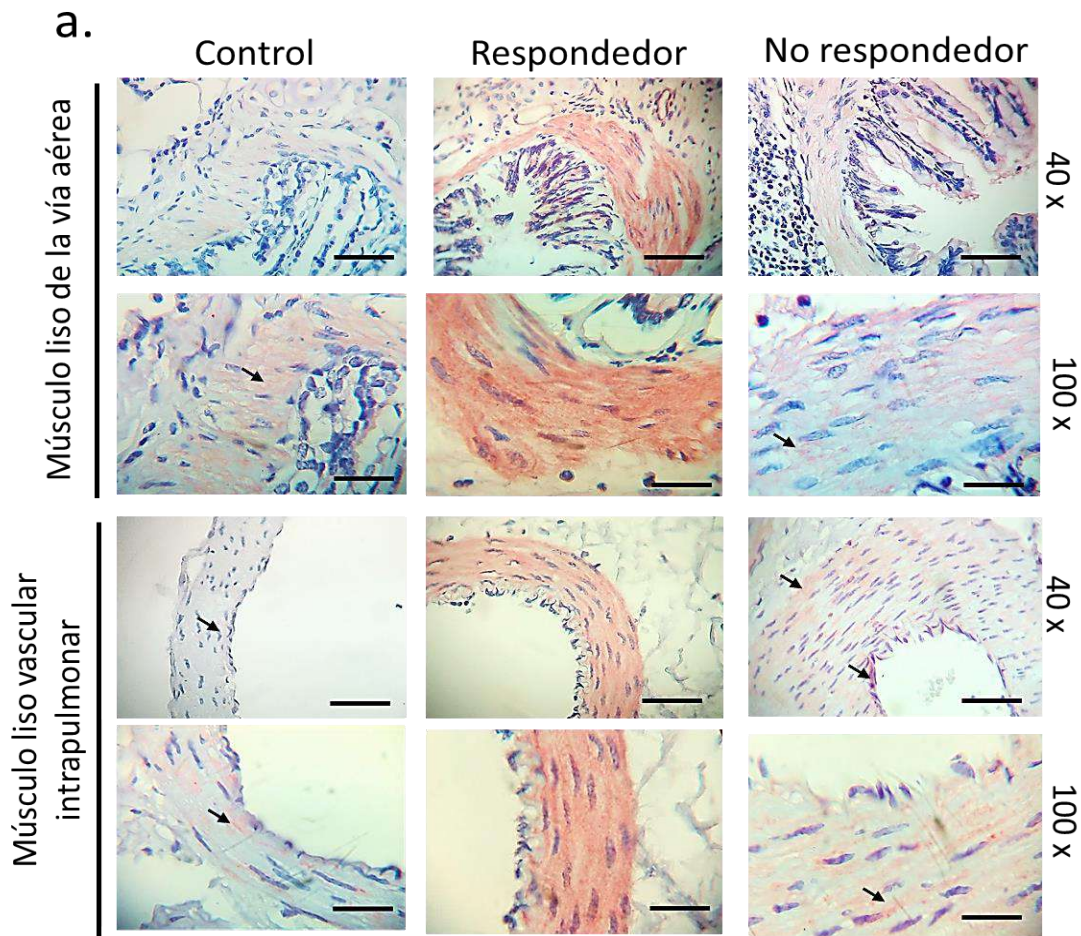


Figura 20. Expresión de la isoforma LN α 1 en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). **a.** Las micrografías muestran la presencia de la proteína en color rosa o rojo según la intensidad **b.** La intensidad de la inmunotinción indica cuanto laminina se está expresando. Los animales respondedores (R) tuvieron una intensidad mayor en MLVA bronquial y MLVI en relación de los controles y NR ($p < 0.01$). Cromógeno usado: AEC. Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μ m. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m. ANOVA 1 vía. PostHoc Bonferroni. $n = 6$ cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, **Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$.

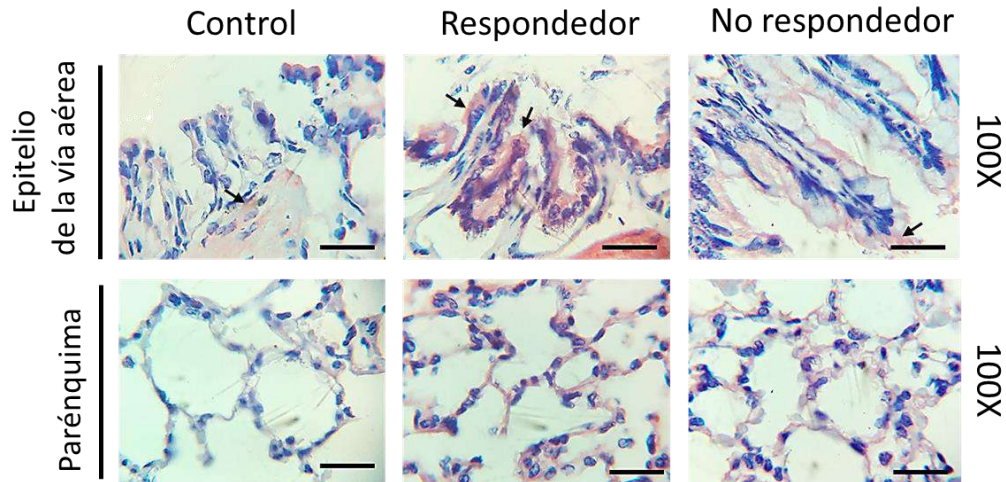


Figura 21. Inmunolocalización de la isoforma LN α 1 en epitelio de la vía aérea y parénquima. Se tomaron micrografías de epitelio bronquial y parénquima para observar la presencia de Ln α 1 en otras estructuras, y determinar si hay posibles cambios en estas. Se observa que hay ligera tinción en el parénquima de cobayos controles y NR, pero hay un incremento en los modelos respondedores. Las micrografías muestran la presencia de la proteína en color rosa o rojo según la intensidad. Cromógeno usado: AEC, Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

6.4.2 Isoforma LN α 2

La presencia de LN α 2 sólo fue observada en el MLVA y MLVI en cobayos R. El grupo control presentó poca o nula tinción para esta cadena de laminina y, los cobayos NR no presentaron expresión de LN α 2 en ninguno de los músculos lisos analizados (Fig. 22a). La simple presencia de LN α 2 de forma exclusiva en los cobayos R indica que hay una diferencia en la expresión de esta subunidad en los grupos estudiados, adicionalmente, esta diferencia mostró ser significativamente mayor ($p < 0.05$) en el MLVA y MLVI del grupo R (Fig. 22b).

Algunas células epiteliales y el parénquima de los cobayos R también mostraron expresión de Ln α 2 (Fig. 23).

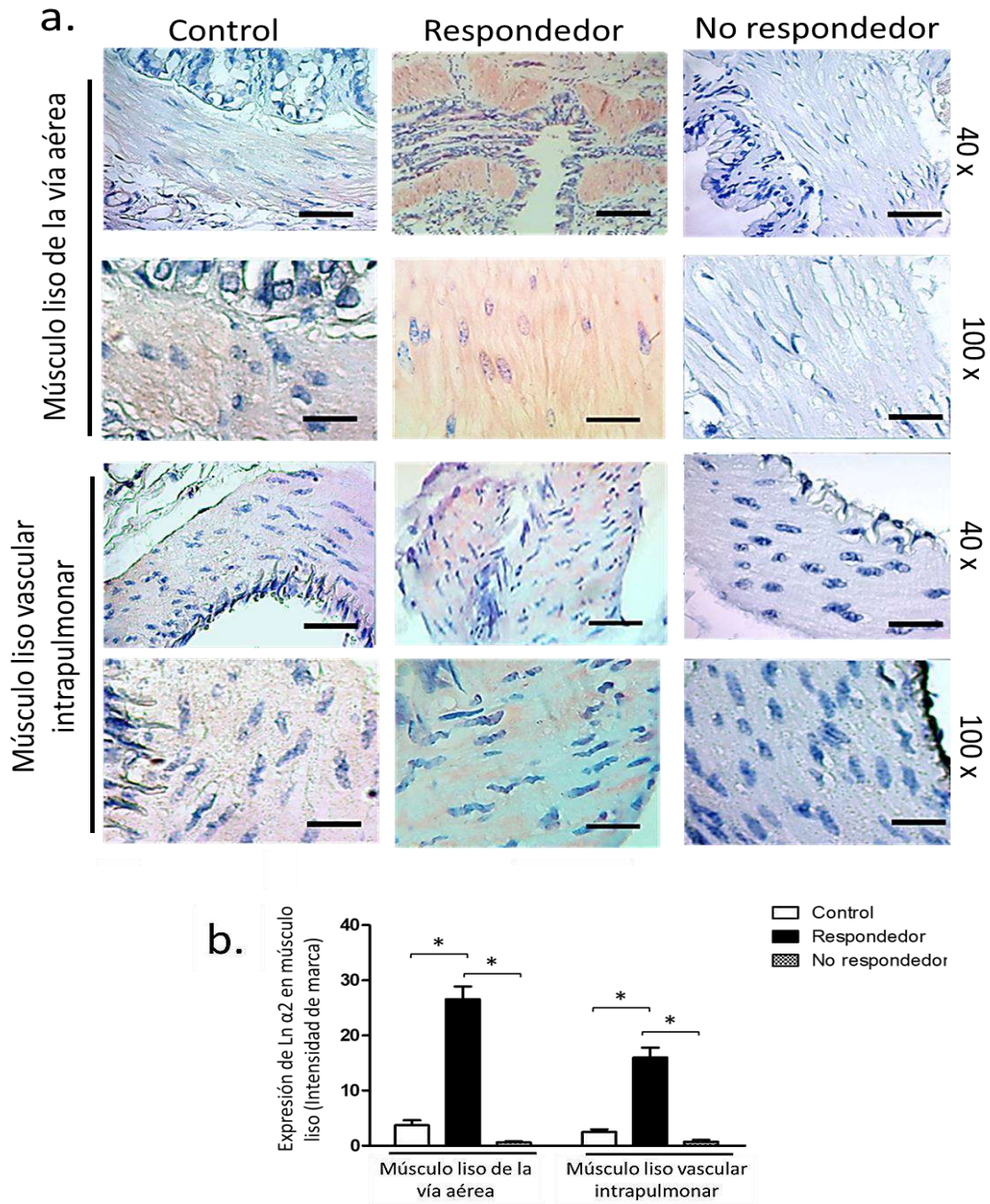


Figura 22. Expresión de la isoforma LN $\alpha 2$ en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). **a.** Micrografías del MLVA y MLVI de los animales control, respondedor (R) y no respondedor (NR), la presencia de LN $\alpha 2$ se observa en color rosa o rojo según la intensidad. El grupo control muestra una ligera tonalidad rosada, mientras que en el grupo R la marca es mucho más intensa en ambos músculos lisos. No se encontró presencia en los animales NR. **b.** La intensidad de marca en los animales R es significativamente mayor ($p < 0.05$), en MLVA y MLVI. Cromógeno usado: AEC, Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μm . Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μm ANOVA 1 vía. PostHoc Bonferroni. $n = 6$ cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

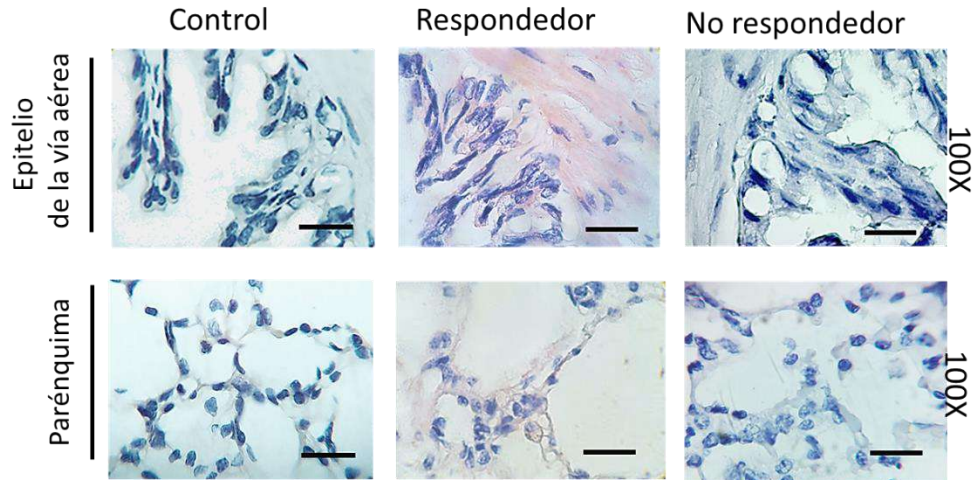


Figura 23. Inmunolocalización de la isoforma LN α 2 en epitelio de la vía aérea y parénquima. El epitelio y parénquima de los animales respondedores muestra una ligera tinción. Las micrografías muestran la presencia de la proteína en color rosa o rojo según la intensidad. Cromógeno usado: AEC, Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

6.4.3 Isoforma LN α 4

Las IHC realizadas para esta isoforma no mostraron tinción en ninguna de las estructuras observadas en ninguno de los grupos (Fig. 24). De forma interesante la expresión de esta proteína se encontró en el mesotelio del pulmón; el mesotelio es una capa de epitelio simple seguido de MEC que recubre los órganos de la cavidad peritoneal y cuya función es el soporte, regulación inmune y transporte de moléculas (Ross, 2011).

En la figura 25 se muestran micrografías de esta estructura en los animales controles (a), no respondedores (b) y respondedores (c y d). Los cobayos controles y NR muestran una distribución de la proteína de forma muy similar, al igual que la morfología del mesotelio. Por otra parte, la marca de Ln α 4 en animales respondedores se ve mucho más amplia y la forma del epitelio pasa de ser plano a presentar una forma de células cúbicas.

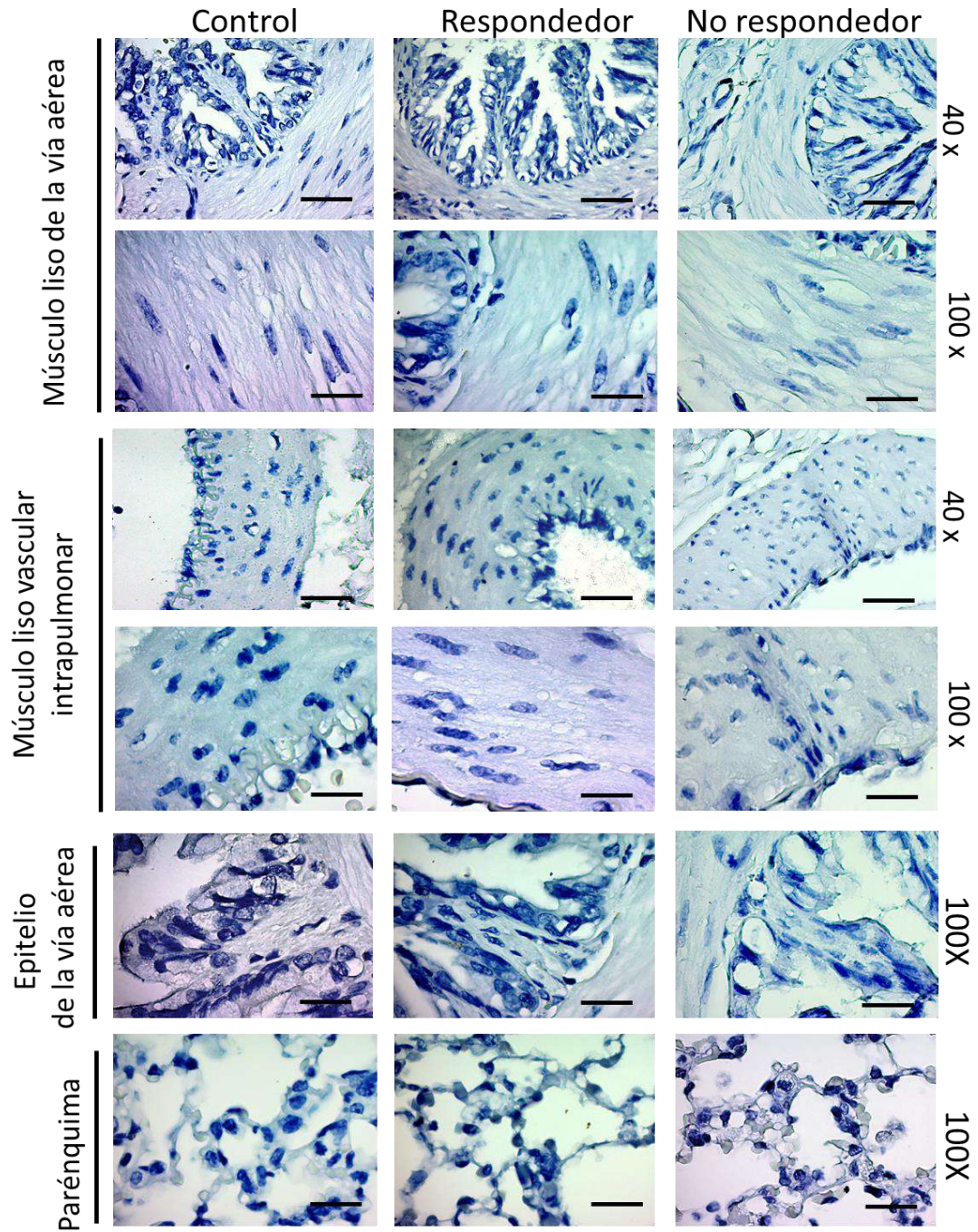


Figura 24. Expresión de la isoforma LN α 4 en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). Las microfotografías muestran distintas estructuras en el pulmón, pero no se observa inmunoreactividad para la proteína. Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μ m. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

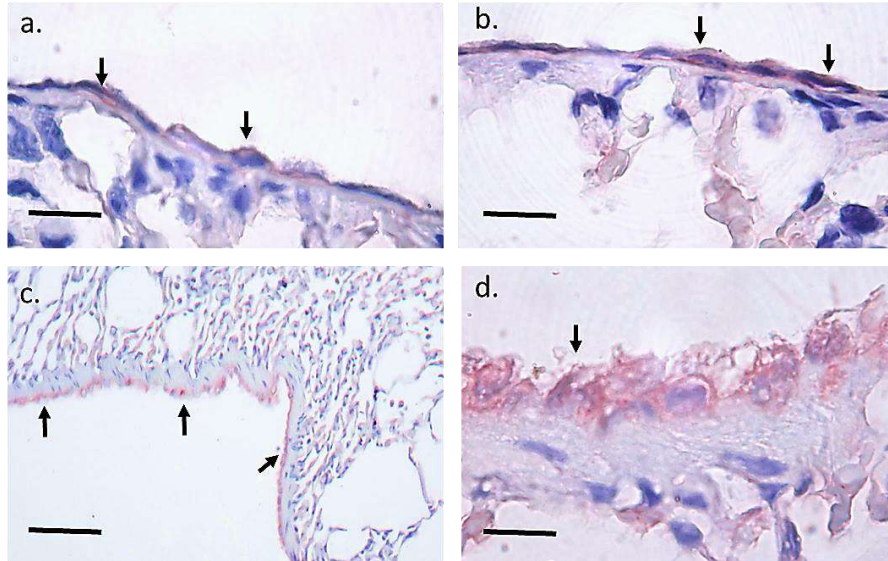


Figura 25. Inmunolocalización de la isoforma LN $\alpha 4$ en mesotelio pulmonar. a. Mesotelio control. La marca que se observa en el epitelio se señala con flechas (100x). **b. mesotelio de un modelo no respondedor (NR).** La morfología del mesotelio (epitelio y MEC) se aprecian de forma similar a lo observado en los animales controles (100X). **c. mesotelio de un modelo respondedor (R).** La marca de LN $\alpha 4$ se aprecia a lo largo de todo el mesotelio como una línea roja (10x). **d. acercamiento del mesotelio de un modelo R.** Tanto en la morfología del epitelio como en el grosor de la MEC subyacente se aprecia un incremento de tamaño (100x). Cromógeno usado, AEC. Líneas de escala: 200 μm con aumento de 10x (c) y 25 μm a 100x (a, b, d).

6.4.4 Isoforma LN $\beta 3$

La isoforma de LN $\beta 3$ se expresó en todos los grupos, tanto en MLVA como en el MLVI (Fig. 26a). Debido a que en la IHC se usó DAB como cromógeno, la tinción desarrollada se observó de color café.

El MLVA mostró una intensidad de marca similar en el grupo control y en los animales R, en cambio, los cobayos NR mostraron un incremento significativo ($p < 0.01$) en la expresión de LN $\beta 3$ (Fig. 26b), desarrollando un color más oscuro. Por otro lado, la expresión de LN $\beta 3$ en MLVI incrementó en los modelos R ($p < 0.01$) y NR ($p < 0.01$), siendo en este último grupo donde se expresó hasta con el doble de intensidad comparada con los animales controles y R (Fig. 26b).

Los músculos lisos bronquial y vascular fueron los únicos sitios donde se expresó LN $\beta 3$ ya que no hubo tinción en epitelio bronquial ni parénquima (Fig. 27).

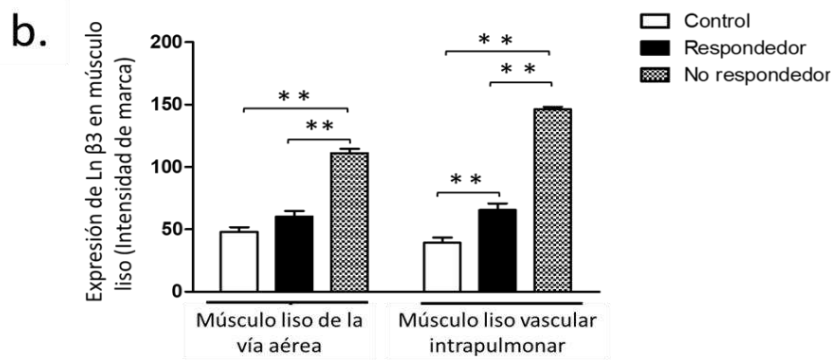
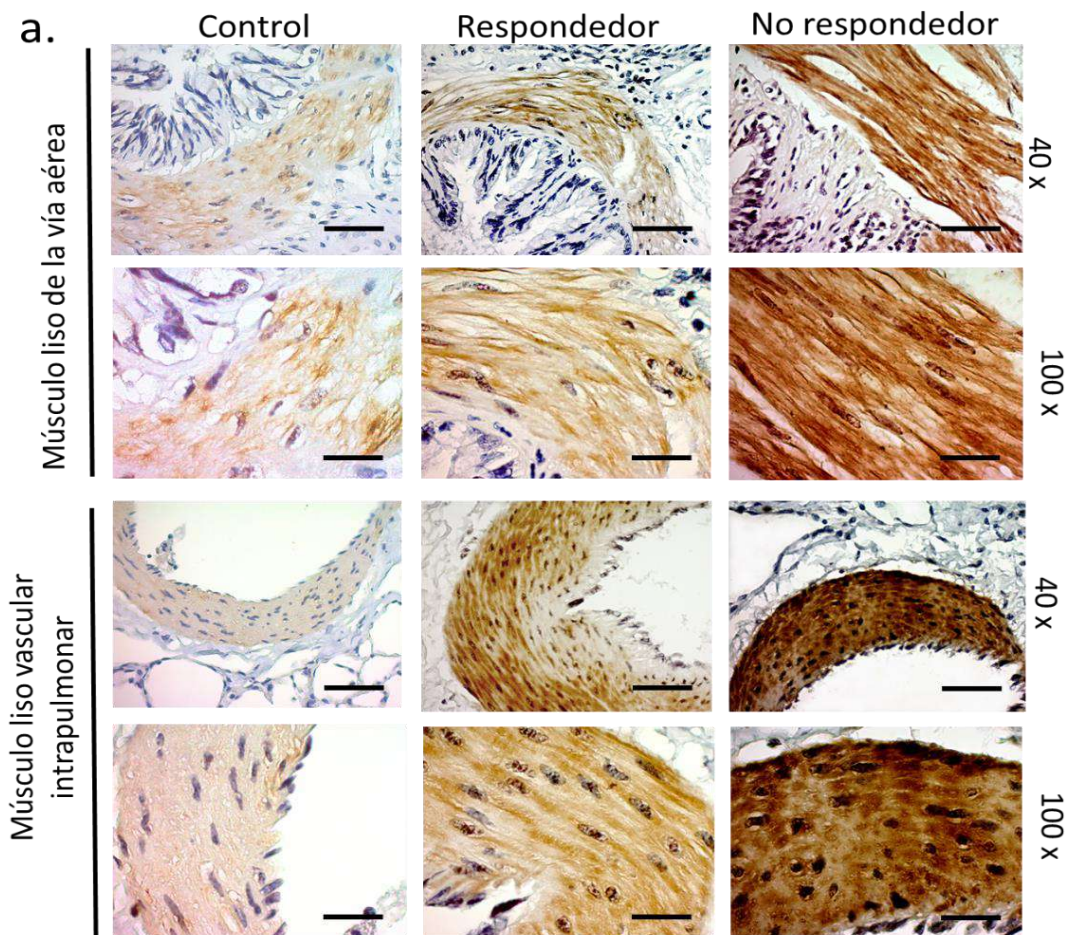


Figura 26. Expresión de la isoforma LN β3 en músculo liso de las vías aéreas (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). **a.** Micrografías representativas del MLVA y MLVI de los cobayos controles, respondedores (R) y no respondedores (NR). El incremento de laminina en el MLVA y MLVI del grupo NR es observable a simple vista. También se observa incremento en el MLVI del grupo respondedor en comparación de los controles. **b.** El incremento de la intensidad de marca es significativo ($p < 0.01$) en el MLVA y MLVI del grupo NR, y en el MLV de los cobayos R ($p < 0.05$). Cromógeno usado: DAB. Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μm . Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μm . ANOVA 1 vía. PostHoc Bonferroni. $n = 6$ cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$, **Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$.

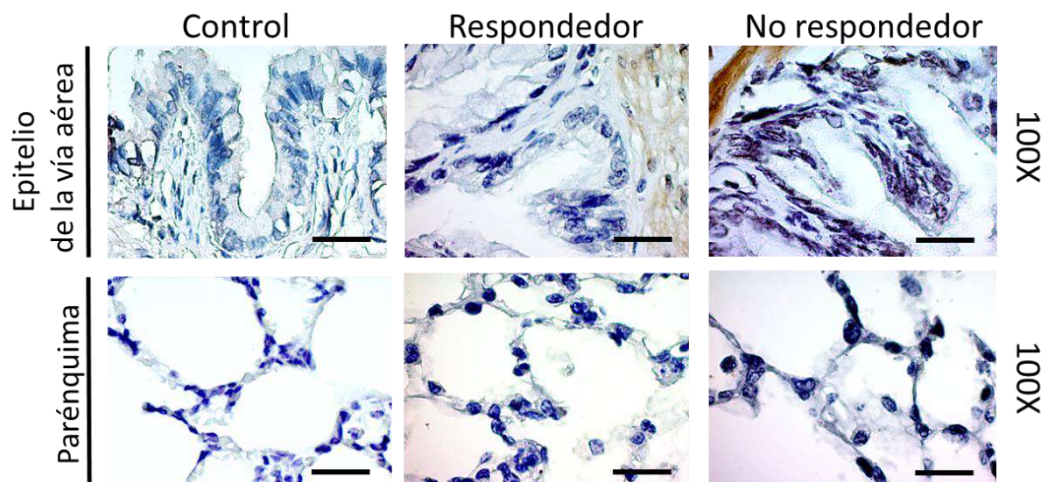


Figura 27. Inmunolocalización de la isoforma LN 83 en epitelio de la vía aérea y parénquima. No se observó presencia de laminina en epitelio o en parénquima de los grupos. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

6.4.5 Isoforma LN γ 1

Todos los grupos presentaron expresión de LN γ 1 en el MLVA y el MLVI. Visualmente, la expresión de LN γ 1 en el MLVA de cobayos controles y R fue similar. El análisis de la intensidad de marca, indica que no hay aumento significativo LN γ 1 en ningún modelo ($p < 0.05$) (Fig. 28b). Los cobayos NR tuvieron una intensidad de marca similar a la del grupo control, pero la laminina sólo se encuentra en algunas regiones del MLVA (Fig. 28a).

La intensidad de marca de LN γ 1 en MLVI en el modelo R y NR fueron similares, y con un incremento significativo ($p < 0.05$) en su expresión en comparación al grupo control, donde no hay expresión de LN γ 1 en el músculo liso, pero sí en endotelio (Fig. 28a y b).

Esta subunidad de laminina se encuentra distribuida de forma más amplia en el pulmón; en la figura 29 se muestra la expresión de LN γ 1 en epitelio y parénquima. Las células epiteliales del grupo R muestra ligera tinción para esta proteína, mientras que, en el parénquima, de todos los grupos, se observa una expresión similar de la proteína.

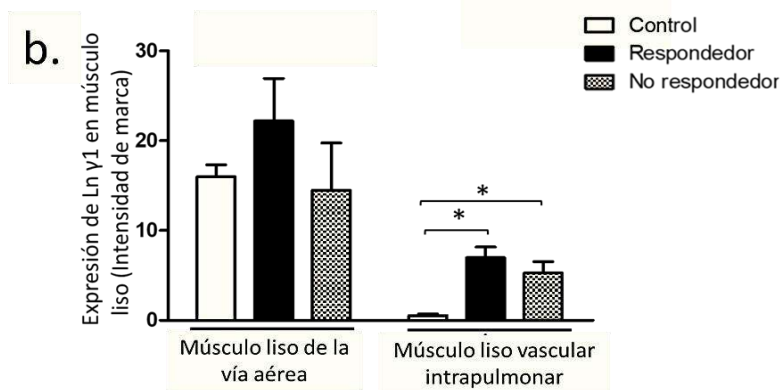
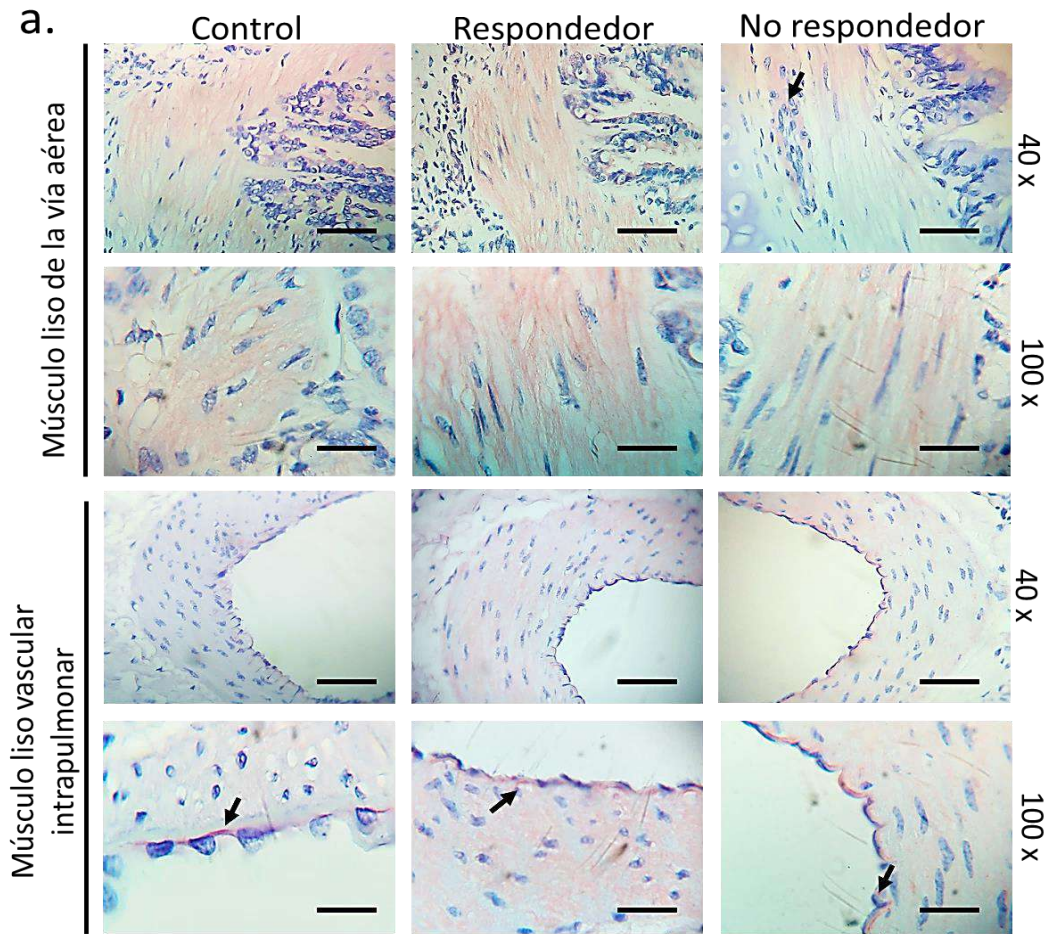


Figura 28. Expresión de la isoforma LN γ 1 en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). **a.** Las micrografías muestran la distribución de LN γ 1 en el MLVA y MLVI de cobayos controles, respondedores (R) y no respondedores (NR). La expresión de LN γ 1 en MLVA del grupo control es similar a lo observado en los R. Los animales NR parecen no tener presencia de esta proteína, sin embargo, la flecha negra muestra una zona con una ligera tinción. En el MLVA el grupo R y NR mostraron una expresión parecida, mientras que en el control sólo se observa una línea roja en el endotelio (flecha negra). **b.** La intensidad de LN γ 1 en el MLVA es parecida en controles y R, y mayor en comparación al grupo NR ($p < 0.05$) quienes no presentan expresión de esta proteína. En el MLVI la expresión es mayor en los cobayos R y NR ($p < 0.05$). Cromógeno usado: EAC, Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μ m. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m. ANOVA 1 vía. PostHoc Bonferroni. $n = 6$ cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

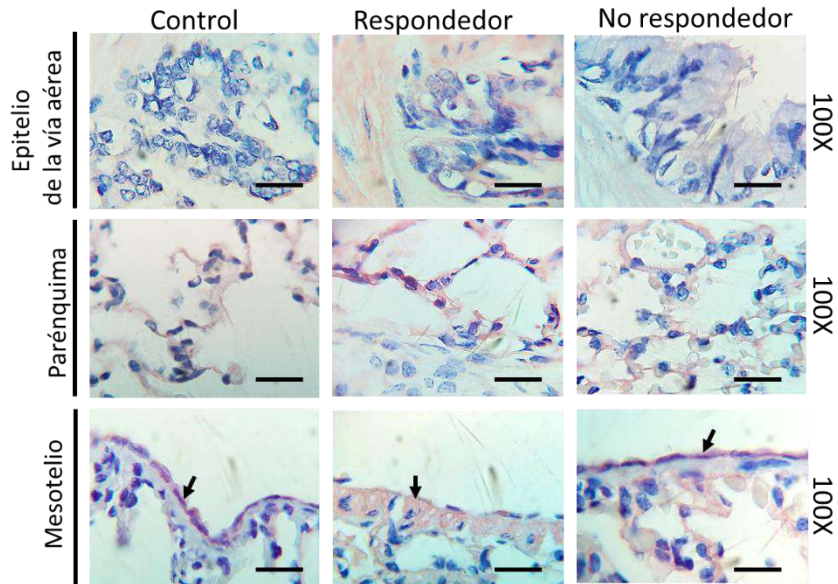


Figura 29. Inmunolocalización de la isoforma LN γ 1 en epitelio de la vía aérea, parénquima y mesotelio. No se observó presencia de laminina en epitelio o en parénquima de los grupos. Cromógeno usado: AEC. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

El mesotelio también presentó expresión de LN γ 1.

6.4.6 Isoforma LN γ 2

Intensidad de marca

La isoforma de LN γ 2 se expresó de forma similar en el MLVA y MLVI en todos los grupos (Fig. 30a); la intensidad de marca no mostró ninguna diferencia significativa entre los grupos (Fig. 30b).

Otra estructura que presentó tinción de LN γ 2 fue el epitelio de los cobayos R y NR (Fig. 31).

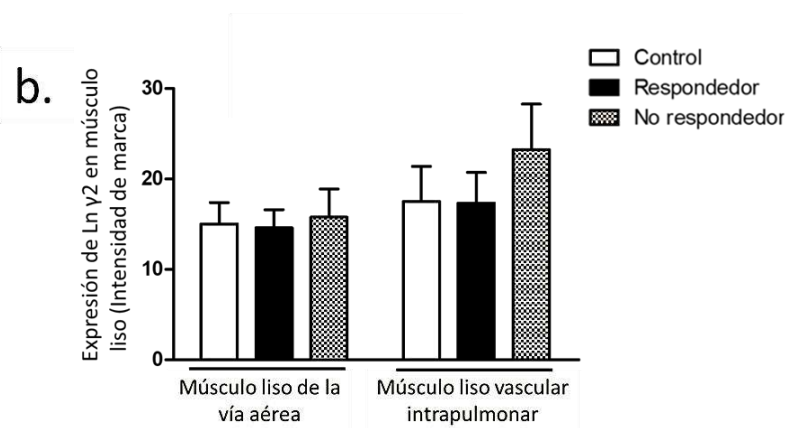
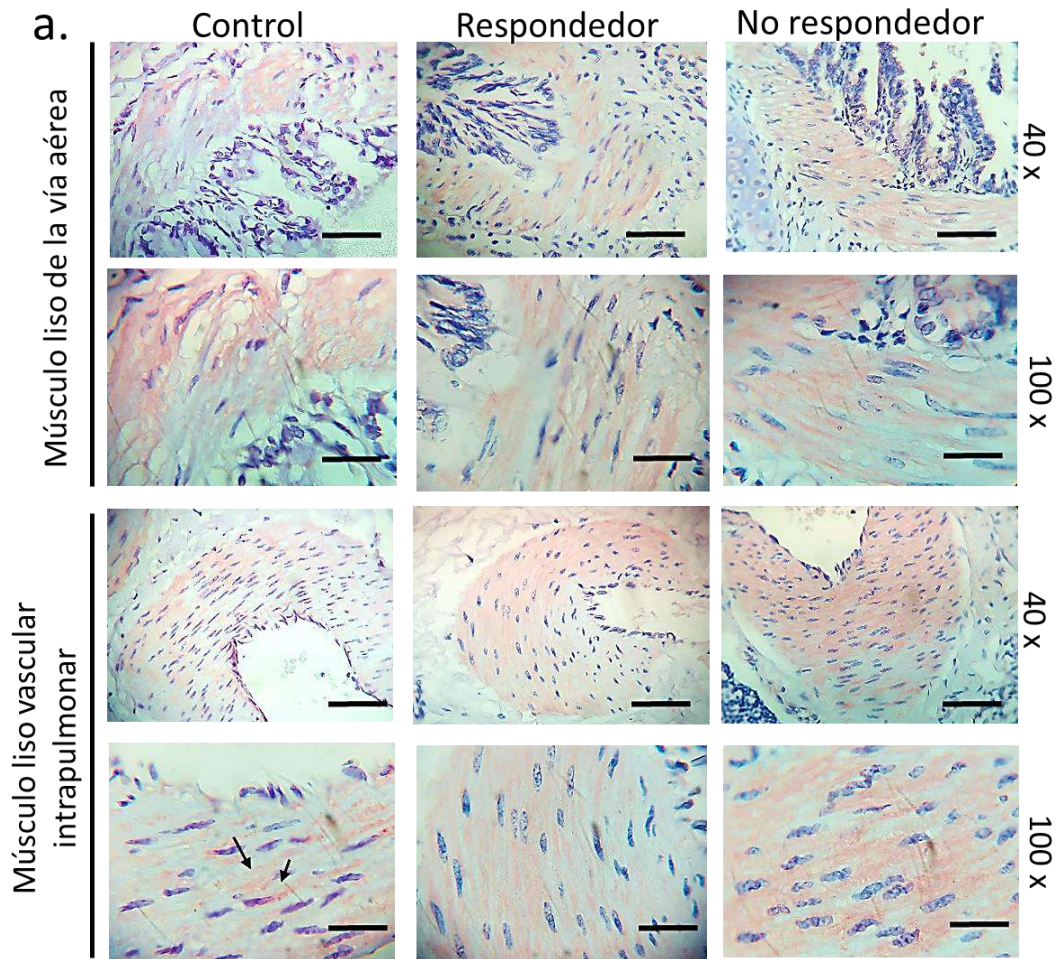


Figura 30. Expresión de la isoforma LN γ 2 en músculo liso de la vía aérea (MLVA) y músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI). **a.** Micrografías representativas de la expresión de LN γ 2 en MLVA y MLVI observada en cobayos controles, respondedores (R) y no respondedores (NR). **b.** La expresión de LN γ 2 en el MLVA y MLVI de todos los grupos fue similar. Cromógeno usado: AEC. Aumento: 40x, barras de escala equivalente a 50 μ m. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m. ANOVA 1 vía PostHoc Bonferroni. n= 6 cobayos por grupo. *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

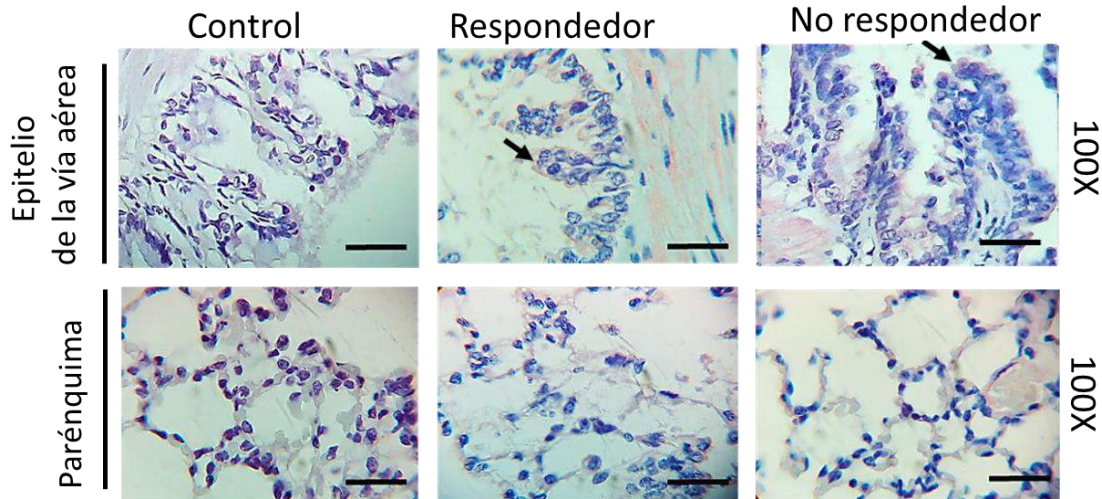


Figura 31. Inmunolocalización de LN γ 2 en epitelio de la vía aérea y parénquima. Se observa una ligera tinción de LN γ 2 en el epitelio de los cobayos R y NR (flechas negras). No se encontró expresión de LN γ 2 en el parénquima de los grupos estudiados. Cromógeno usado: AEC. Aumento: 100x, barras de escala equivalente a 25 μ m.

6.4.7 Otras isoformas de laminina

Las subunidades LN α 3, α 5, β 1 y γ 3, no mostraron una inmunotinción positiva en ninguna de las estructuras analizadas, por lo que no se incluyeron las imágenes ni el análisis de la intensidad de marca y proporción.

6.5 Expresión de las isoformas de laminina y los posibles trímeros de laminina en cobayos controles, R y NR

Previamente, por IHC, se ha comprobado que LN β 2 se expresa en animales controles, R y NR, siendo estos últimos los que presentaron una mayor intensidad de tinción (Pacheco- Alba, 2016). Por lo que, junto con los resultados obtenidos en este trabajo se sabe que de forma normal (controles), el MLVA expresa (debido a que tuvo una tinción de IHC positiva) las isoformas LN α 1, LN α 2, LN β 2, LN β 3, LN γ 1 y LN γ 2 (Fig. 32, Control). Por la expresión de estas isoformas en el tejido podría sugerirse que estén

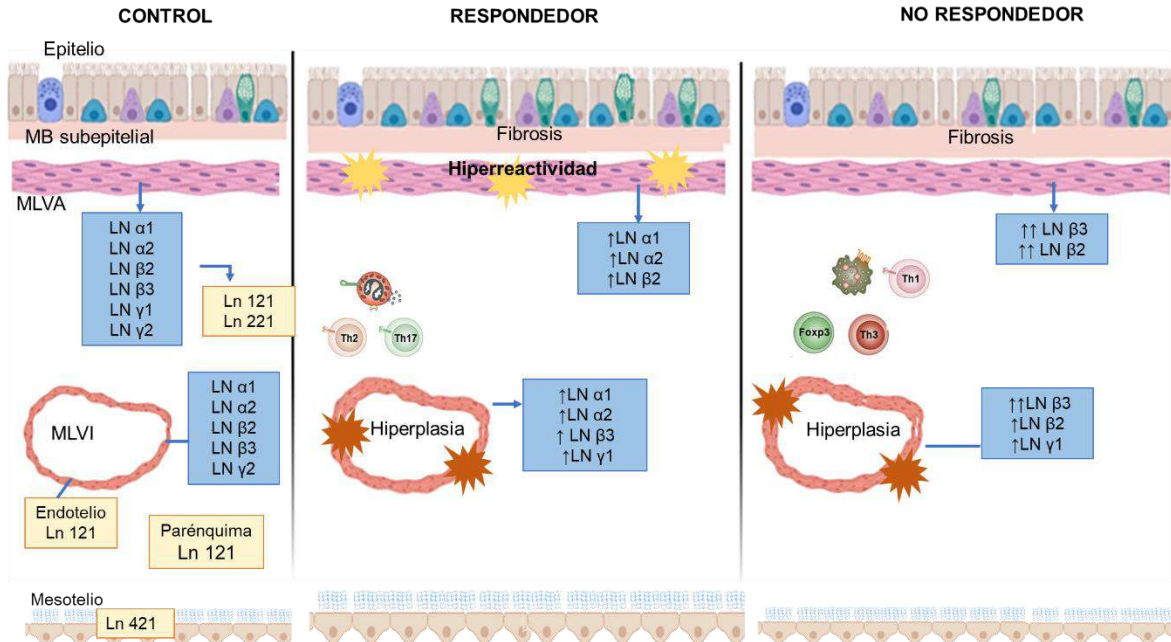


Figura 32. Expresión y localización de distintas isoformas de laminina en distintas estructuras del pulmón de cobayos controles, respondedores (R) y no respondedores (NR) al reto antigénico. La imagen muestra las distintas estructuras pulmonares analizadas: músculo liso de la vía aérea (MLVA), músculo liso vascular intrapulmonar (MLVI), parénquima (alveolos) y mesotelio; así como las isoformas que se encontraron expresadas en dicha estructura y los posibles trímeros de laminina formados. En cobayos respondedores (R) y no respondedores (NR) solo se indican las isoformas que fueron sobre expresadas (↑ aumento en la expresión por intensidad de marca o ↑↑ cuando el incremento fue aún mayor). También se indican las características de cada grupo. **Controles.** De forma normal el MLVA expresa LN α1, LN α2, LN β2, LN β3, LN γ1 y LN γ2, que podrían formar los trímeros Ln 121 y Ln 221. En el MLVI se expresan las mismas isoformas a excepción LN γ1 por lo que no es posible sugerir la expresión de un trímero. El endotelio y el parénquima probablemente expresan Ln 121 ya que se encontraron las tres isoformas. El mesotelio expresa LN α4 y LN γ1. **Respondedor.** En el grupo R el MLVA presenta hiperreactividad (formas amarillas), el MLVI presenta hiperplasia (figuras naranjas) infiltración de células Th2, Th17 y eosinófilos. El MLVA tuvo incremento en la intensidad de marca LN α1, LN α2 y LN β2. Por otro lado, el MLVI presentó sobre expresión de LN α1, LN α2, LN β3 y LN γ1, al igual que en el MLVA no se puede asegurar que se encuentran en trímeros o no. **No respondedores.** Las cadenas Ln β2 y Ln β3 tuvieron un incremento en el MLVA y MLVI, mientras que Ln γ1 sólo se incrementó en MLVI de este grupo.

formando trímeros Ln 121 o Ln 221, sin embargo, esta es solo una suposición y son necesarios más estudios para asegurarlo.

El MLVI expresó las mismas cadenas que el MLVA a excepción de la LN γ1, que sólo se encontró en el endotelio. Por la falta de expresión de LN γ1 sobre este músculo no se puede sugerir la expresión de algún trímero (Fig. 32, Control).

Finalmente, el parénquima expresa principalmente Ln 121 mientras que el mesotelio LN 4 y LN γ1 (Fig. 32, Control).

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de laminina en los modelos R y NR muestran que los mayores cambios observados son incrementos en la intensidad de tinción de algunas isoformas de laminina, en el MLVA y MLVI (Fig. 32).

Los cobayos R tuvieron incrementos en la tinción de isoformas de laminina LN α 1, LN α 2 y LN β 2 en el MLVA y de LN α 1, LN α 2, LN β 3 y LN γ 1 en el MLVI. Por otro lado, los cobayos NR, presentaron incrementos de isoformas de laminina LN β 2 y LN β 3 en el MLVA y MLVI, este último también tuvo incremento de LN γ 1. Por las isoformas sobre expresadas en cobayos R y NR no se puede sugerir la sobre expresión de una trímero.

Estos resultados fueron con base a estudios semi- cuantitavos, evaluando la intensidad de tinción, los cuales sólo sugieren que hay un incremento en la expresión de algunas isoformas de laminina y, por tanto, el aumento en la expresión (cuantitativa) debe ser confirmados con otras técnicas.

7. DISCUSIÓN

7.1 Respuestas bronco-obstructivas a los retos antigénicos en el modelo R y NR

En los cobayos sensibilizados se observaron dos respuestas bronco-obstructivas después de cada reto antigénico. Una de estas, fue la “respuesta típica”, donde los animales sensibilizados presentaron aumentos en el \dot{V}_B después del reto antigénico, cobayos R, y otro grupo que no presentó obstrucción después del reto antigénico, cobayos NR. La evaluación de la hiperreactividad de la vía en estos modelos crónicos mostró que los cobayos R y NR no tienen la misma respuesta a la histamina. Los cobayos R presentan hiperreactividad de la vía aérea, es decir, el MLVA necesita una concentración menor de histamina para contraer, mientras que los cobayos NR no son hiperreactores.

El tipo de células inflamatorias encontradas en el LBA de los cobayos R y NR muestra que ambos grupos tienen incrementos en el número de linfocitos infiltrados, pero diferencias en otros tipos celulares. En el LBA de los cobayos R hay un incremento del número de eosinófilos, mientras que, en los cobayos NR predominan los neutrófilos.

Las características observadas en los cobayos R y NR se ajustan a los modelos descritos por Ramos-Ramírez (2013): los cobayos R, tienen incrementos en el \dot{V}_B después del reto antigénico, hiperreactividad de la vía aérea e incremento en eosinófilos, lo cual también se ajusta a los modelos de asma alérgica, por otro lado, los cobayos NR, no tienen incremento en el \dot{V}_B después del reto, no son hiperreactores y predominan los neutrófilos en el LBA. Cabe mencionar que el tipo de linfocitos infiltrados en los grupos no fue determinado.

7.2 Expresión de las isoformas de laminina por IHC en cobayos

Las inmunotinciones realizadas para las isoformas LN α_3 , LN α_5 , LN β_1 y LN γ_3 no mostraron una tinción positiva que indicara la presencia de dichas isoformas. En un

estudio paralelo (datos y resultados no mostrados), los anticuerpos para LN $\alpha 5$ y LN $\beta 1$ han mostrado reactividad con estas isoformas en LBA y sueros sanguíneos, esto sugiere que los anticuerpos sí reconocen las isoformas de laminina y que, probablemente, la falta de detección en tejido sea debido a que no se exprese en el MLVA y MLVI o su detección sea difícil en tejido. Por otro lado, los anticuerpos para LN $\alpha 3$, LN $\gamma 3$ no mostraron detección en ninguno de los casos por lo que podría no haber expresión de estas isoformas o podría deberse a los anticuerpos utilizados. En vista de que este estudio también busca determinar la presencia de isoformas de laminina en el pulmón de cobayos no se contó con información previa respecto al uso de anticuerpos o presencia previa de laminina, de manera que en aquellos anticuerpos que no tuvieron reacción ahora se puede optar por otras alternativas. No obstante, se logró identificar un gran número de isoformas de laminina en diversas estructuras pulmonares, además de cambios en la presencia de las isoformas de laminina que podrían asociarse a los cobayos R y NR.

La IHC es una técnica muy útil que permite hacer un primer acercamiento a la expresión de laminina en el pulmón de los cobayos, los cuales son un modelo muy utilizado para diversas enfermedades. La intensidad de tinción generada analizada por métodos semi cuantitativos (que no cuantifica de forma directa la cantidad de proteína), posibilita hacer una **aproximación** del comportamiento de la presencia de laminina, tras el aumento de la marca positiva de la tinción en los grupos estudiados. Un aumento en la tinción ha sido asociada a un posible aumento en la expresión de la proteína de interés (Nguyen, 2013; Crowe, 2019), sin embargo, hay que tener en cuenta que la intensidad de marca generada en la IHC puede variar por diversos factores, entre los cuales se encuentran: la concentración y marca del anticuerpo, los tiempos de incubación, métodos de recuperación antigénica y los cromógenos utilizados, por lo que es necesario hacer estudios cuantitativos para reafirmar estos datos. De manera interesante, al homogeneizar estos factores en cada IHC para cada isoforma de laminina realizada en este trabajo se observaron patrones en las tinciones, los cuales son discutidos en el siguiente contenido.

7.3 Las isoformas de laminina se expresan principalmente dentro del MLVA y MLVI

Con los resultados obtenidos se pueden hacer dos observaciones principales respecto al incremento de isoformas de laminina en los cobayos R y NR: la primera es que, de forma interesante, pareciera que estas isoformas se incrementan de forma monomérica, ya que las isoformas acompañantes, con las que forma trímero, no se incrementaron de la misma manera (Fig. 32), la segunda es que la laminina pese a ser una glicoproteína de MB parece estar expresándose dentro de las células del MLVA y el MLVI, ya que la tinción no se limita a la periferia de los miocitos si no que abarca toda la células como se puede apreciar en las imágenes correspondientes a las IHC.

Respecto a estos puntos se sabe que la sobreproducción de una sola isoforma de laminina, sin otras cadenas con la que forma trímero es conocida como “producción descoordinada” y ha sido reportada en diversos trabajos donde, mediante IHC analizan la expresión de laminina en pacientes con padecimientos como asma alérgica, ocupacional, estacional, no alérgica y EPOC (Kawa, 2005; Kranenburg, 2006; Altraja, 1996). Esta producción descoordinada de isoformas de laminina es “común” principalmente en procesos patológicos por ejemplo en fibrosis, remodelación o cáncer, donde se asocian a cambios funcionales del tejido (Kawa, 2005). Por otro lado, la sobre producción de una cadena no indica que esté siendo secretada, y no son aislados los estudios que señalan que estas isoformas se acumulan en el citoplasma del epitelio y del MLVA donde tienen efectos aun poco entendidos, pero indican que podrían estar relacionados con aumentos en la supervivencia y cambios en la distensibilidad del MLVA (Kawa, 2005; Kadoya, 1989; Takahasi, 2002; Szelachowska, 2006; Yick, C. 2012, Tunga, 2000).

Otras investigaciones señalan, de manera general, que los efectos por la acumulación de elementos de MB y MEC dentro del MLVA depende de la proteína o glicoproteína sobre expresada, y que algunos de estos incrementos en individuos con asma se relacionan con la severidad de la enfermedad, aunque, por el poco conocimiento de este proceso, estas ideas continúan en debate (Parameswaran, 2006; Yick, 2012; Araujo, 2008; Slats, 2008). En este sentido, con los resultados obtenidos el aumento de distintas isoformas de laminina encontradas dentro del MLVA y MLVI también parecen

estar asociadas a los cambios en las respuestas fisiológicas observadas en ambos grupos, ya que los cobayos R y NR tienen incrementos en distintas isoformas.

7.4 Las isoformas de laminina expresadas en cobayos R y NR están asociadas a distintas posibles funciones

Los cobayos R y NR presentan distintas características inmunológicas y fisiológicas ante los retos antigénicos, adicionalmente, en este trabajo se muestra que el aumento de distintas isoformas de laminina es otra diferencia entre ambos grupos. Aunque se desconoce la razón de este acontecimiento, una posible razón es que la respuesta de células inmunológicas que muestra cada modelo (R con linfocitos Th2 y eosinófilos; NR con Treg+ y neutrófilos) puede regular la sobre producción de distintas cadenas.

A pesar de que aún se desconoce la función de las lamininas en el pulmón, tanto en trímero como en monómero, se ha logrado conocer mucho sobre su posible función en el pulmón adulto a partir de su expresión en distintas etapas del desarrollo o con modelos experimentales (Nguyen, 2006). La expresión de distintas cadenas observadas en los resultados obtenidos en cobayos R y NR junto con los datos aportados en otros trabajos indican que el incremento de distintas isoformas en los grupos de cobayos podría contribuir de forma distinta a las respuestas fisiológicas observadas en ambos grupos; aumentando la contracción del MLVA en cobayos R y disminuyendo la contracción en cobayos NR.

7.4.1 Los cobayos R sobre expresan principalmente isoformas LN α 1 y LN α 2 en MLVA y MLVI

Diversas investigaciones indican que la expresión de las isoformas de laminina LN α 2 y LN α 1 se restringen al desarrollo (datos contradictorios) pero, mientras que, LN α 1 es esencial para la formación del pulmón, la ausencia de LN α 2 no provoca afectaciones en el mismo (Burgastaller, 2017; Virtanen, 1996; Pierce, 2000; Nguyen, 2006; Schuger,

1997). Los resultados obtenidos muestran que los cobayos controles expresan LN α 1, y LN α 2, pero hay incremento estas isoformas en cobayos R.

El aumento de LN α 2 y LN α 1 encontrado concuerda con algunos trabajos que reportaron aumento de estas cadenas en personas con asma alérgica crónica y en modelos animales de alergia, sin embargo, estos estudios reportan dicho aumento en MB subepitelial y no en músculo liso, como se encontró en los resultados obtenidos. La información de la expresión de LN α 1 es contradictoria, por ejemplo, Altraja (1996), por IHC, reportó el aumento de LN α 1 en MB subepitelial, vasos sanguíneos y músculo liso de pacientes con asma estacional, ocupacional y alérgica (crónica), mientras que Kawa (2005), en un estudio similar, mencionó que sólo había una tinción ligera en la membrana basal en pacientes de asma alérgica, pero en sujetos sanos esta cadena no se expresa (Kawa, 2005; Altraja, 1996; Christie, 2004).

El aumento de las isoformas LN α 1 y LN α 2 encontrados en el MLVA de los cobayos R puede estar relacionado con la hiperreactividad observada en estos cobayos ya que ambas isoformas han sido asociadas al mantenimiento y la contracción del MLVA.

La sobre expresión de LN α 1 se ha asociado a procesos de remodelación en pacientes con asma (Amin, 2005; Christie, 2004; Altraja, 1996), durante los cuales se cree que podría tener funciones similares a las que regula en el desarrollo, por ejemplo, se sabe que durante el desarrollo LN α 1 es fundamental para mantener la organización del MLVA (Hirts, 2000; Dekkers, 2007; Schuger, 1997). Probablemente, el aumento de esta subunidad esté manteniendo la organización del MLVA y MLVI de los cobayos R.

Por otra parte, diversos estudios han resaltado la importancia de LN α 2 en los músculos lisos más allá del desarrollo. En cultivos celulares la expresión de esta cadena coincide con la diferenciación de células mesenquimales a miocitos (Relan, 1999; Bejag, 2002). Mientras que en las células musculares lisas maduras, la presencia de LN α 2 es suficiente para promover la supervivencia del músculo liso debido a que promueve la acumulación de proteínas anti-apoptóticas (Tran, 2013; Tran 2006). Adicionalmente, esta cadena es esencial para la contracción del músculo liso en ratones sensibilizados ya que los ratones *Lama2^{-/-}*, no presentaban respuestas bronco-obstructivas después los retos antigénicos y no tienen hiperreactividad del MLVA (Tran, 2006; Tran, 2013).

En este sentido, la sobreexpresión de LN $\alpha 2$ en el MLVA de los cobayos R podrían promover o facilitar el aumento de las respuestas bronco-obstructivas y la hiperreactividad de la vía aérea después de los retos antigénicos. En tanto, la sobreexpresión en el MLVI puede estar mediando la supervivencia de las células musculares, mientras que los factores de crecimiento presentes durante la remodelación, como TGF- β , inducen su proliferación.

7.4.2 Los cobayos NR sobre expresan principalmente isoformas LN $\beta 2$ y LN $\beta 3$ en el MLVA y MLVI

Las investigaciones sobre la expresión y función de las isoformas de laminina LN $\beta 2$ y LN $\beta 3$ durante el desarrollo indican que no son isoformas esenciales para la formación del pulmón debido a que los ratones knock out de LN $\beta 2$ nacen sin defectos en el pulmón y modelos knock out de LN $\beta 3$ no han sido desarrollados. (Nguyen 2006; Gesdorff, 2005). De acuerdo con los resultados obtenidos los cobayos expresan ambas isoformas de forma normal (controles), pero el grupo NR muestra un claro incremento de estas.

Estudios en humanos han reportado incrementos de LN $\beta 2$ en MB subepitelial de pacientes con asma alérgica y no alérgica (Kawa, 2005; Altraja, 1996); pero también se ha encontrado acumulación en el MLVA de pacientes con diversos tipos de asma y en pacientes con EPOC (Altraja, 1996; Kranenburg, 2006). Los trabajos que han reportado sobre-expresión de esta isoforma dentro del MLVA mencionan que la acumulación de LN $\beta 2$ en el MLVA tiene mayores efectos fisiológicos que la acumulada en la MB subepitelial, observada en pacientes con asma (Altraja, 1996; Kawa, 2005), debido a que la cantidad de LN $\beta 2$ acumulada en la MLVA se correlaciona directamente con el decremento del volumen de aire espirado (FEV1), por generar una mayor resistencia en la expansión del MLVA en pacientes con EPOC, contribuyendo con el deterioro de la función pulmonar (Kranenburg, 2006). De manera interesante los cobayos NR que no presentan hiperreactividad presentaron mucha más acumulación de LN $\beta 2$ en el MLVA, en comparación con los cobayos R, por lo que podría aumentar la resistencia del MLVA en los cobayos NR, evitando su contracción.

Por otro lado, la LN β 3 ha sido poco estudiada debido a que no se han reportado cambios importantes y no es una isoforma crucial para el desarrollo del pulmón, por lo que la expresión de LN β 3, o LN α 3 y LN γ 2 (isoformas que forman trímero con LN β 3) en el pulmón adulto ha sido atribuida a procesos de reparación en respuesta al daño o en procesos de enfermedades pulmonares como asma o tumores (Nguyen 2006; Gesdorff, 2005). Contrario a esto, en estudios más recientes señalan que es común la presencia de mRNA de LN β 3 en pulmones de ratones adultos sanos, siendo la tercera isoforma (en cantidades de mRNA) más abundante, por lo que no solo se expresa durante el daño (Burgasteller, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión de LN β 2 y LN β 3 es normal en el MLVA y MLVI de los cobayos, sin embargo, hay un incremento fácilmente observable en la expresión de esta cadena en los animales NR que pueden estar asociadas a la reducción en la función pulmonar como se reportó en los humanos con EPOC y asma con bajos niveles de FEV1 y distensibilidad (Nguyen, 2006; Altraja, 1996; Kawa, 2005, Kranenburg, 2006). , además de que su sobre producción puede ser resultado del proceso de daño y reparación.

7.4.3 La isoforma LN γ 1 se incrementó sólo en el MLVI de cobayos R y NR

El incremento de LN γ 1 ha sido reportado en pacientes con diversos tipos de asma, principalmente en la MB subepitelial (Altraja, 1996; Kranenburg, 2006; Kawa, 2005). La expresión de la isoforma de LN γ 1 sólo fue observada en el MLVI de ambos modelos, que tiene como característica ser proliferativo. Debido a que solo se expresó en el MLVI, esta isoforma podría tener un papel fundamental para la proliferación.

8. CONCLUSIÓN

Los cobayos R y NR crónicos muestran incrementos de distintas cadenas, y posiblemente trímeros, de laminina, principalmente en el MLVA y MLVI.

La diferencia de isoformas de laminina podría contribuir con la diferencia en las respuestas fisiológicas obstructivas en MLVA y MLVI en los cobayos R y NR: en el modelo R el incremento de LN $\alpha 1$ y LN $\alpha 2$ podrían estar facilitando y manteniendo fenotipos contráctiles en el MLVA y supervivencia de células del MLVI, mientras que la acumulación de LN $\beta 2$ y LN $\beta 3$ en el MLVA de cobayos NR podrían contribuir con el incremento en la resistencia del MLVA, impidiendo la contracción e hiperreactividad y la remodelación del MLVA y MLVI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. *Imunología celular y molecular*. (2015). Octava edición. Barcelona, España. Elsevier Saunders
- Altraja, A., Laitinen, A., Virtanen, I., Kämpe, M., Simon, G., et al. (1996). Expression of laminins in the airways in various types of asthmatics patients: a morphometric study. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 15 (4).
- Altraja, S., Kadai, M., Rekker, E., Altraja, A. (2008). Synthesis of tenascin and laminin beta 2 chain in human bronchial epithelial cells is enhanced by cysteinyl leukotrienes via CysLT1 receptor. *Respir Res*. 9 (44).
- Amrani, Y., Panettieri, R. (2003). Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int J Biochem & Cell Biol*. 35: 272- 276.
- Araujo, B., Dolhnikoff, M., Silva, L., Elliot, J., Lindeman, J., Ferreira, D. *et al.* (2008). Extracellular matrix components and regulator in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 32: 61- 69.
- Aumailley, M. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Elsevier*. 9; 326- 332.
- Aumailley, M., Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J Anat*. 193 (1): 1- 21.
- Barber, T., Guillermo P., Marín, M., Timoneda, J. (2014). Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. *Nutrients* 6 (11): 4984-5017.
- Balestrini, L., Niklason, L. (2015). Extracellular matrix as a driver for lung regeneration. *Ann Biomed Eng*. 43 (3): 568- 576.
- Bara, I., Ozier, A., Tunon de Lara, J., Marthan, R., Berger, P. (2010). Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*. 36: 1174- 1184.
- Barnes, P. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 118 (11): 3546- 3556.
- Bazán, B., Guerrero, S., Vargas, M., Cordero, M., Ramos, P., Santos, M., Hiriart, G., Gaxiola, M., Pando, H. (2009). β 1- integrins shedding in a guinea-pig modelo f chronic asthma with remodelled aiways. *Clin Exp Allergy*. 39: 740- 751.
- Bazán, B., Vargas, M., Sánchez, E., Chávez, J., Montaña, L. (2004). Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Exp Physiol*. 89 (5): 623- 628.

- Beck, K., Hunter, I., Engel, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB*. 4: 148- 160.
- Belanto, J., Mader, T., Eckhoff, M., Strandjord, D., Banks, G., Gardner, M. (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America*. 111: 5723- 5728.
- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15: 786- 801.
- Booth, A., Hadley, R., Cornett, A. (2012). Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 186(9): 866-876.
- Bousquet, J., Jeffery, P., Busse, W., Johnson, M., Vignola, A. (2000) Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 161: 1726- 1745.
- Brusasco, V., Crimi, E. (2001). Methacholine provocation test for diagnosis of allergic respiratory diseases. *Eur J All Clin Immunol*. 56 (12): 1114-1120.
- Burgastaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E., Schiller, H. (2017). The intrusive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur Respir J*. 50.
- Burgeson, R., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinmann, H., Martin, G. (1994). A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol*. 14: 209- 211.
- Burgess, J., Ceresa, C., Johnson, S., Kanabar, V., Moir, M., Nguyen, T., *et al.* (2009). Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function. *ELSEVIER*. 22: 379- 387.
- Christie, P., Jones, M., Tsai, C., Chi, E., Henderson, W. (2004). Increase in laminin expression in allergic airway remodeling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J*. 24: 107- 115.
- Colognato, H., Yurchenco, P. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*. 218: 213- 234.
- Criée, S., Sorichter, H., Smith, P., Kardos, R., Merget, D., Heise, D., Berdel, D., *et al.* (2011). Body plethysmography – Its principles and clinical use. *Respir Med*. 105 (7): 957- 971.
- Critchley, D. (2000). Focal adhesions: the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol*. 12: 133- 139.

- Crockcroft, D. (2010). Direct challenge test. Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. CHEST. 138 (2) Suppl: 18s- 24s.
- Crowe, A., Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. Bio Protoc. 9(24): 1- 15.
- Deng, L., Nigel, J., Cole, J., Fredberg, J., Maksym, G. (2005). Airway smooth muscle tone modulates mechanically induced cytoskeletal stiffening and remodeling. Am Physiol Soc. 99 (2): 634- 641.
- Dekkers, B., Maarsingh, H., Meurs, H., Gosens, R. (2009). Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. Proc Am Thorac Soc. 6: 683- 692.
- Dekkers, B., Schaafsma, D., Nelemans, S., Zaagsman, J., Meurs, H. (2007). Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292: 1405- 1413.
- Di Russo, J., Luik, A., Yousif, L., Budny, S., Oberleithner, H., Hofschroer, V., Klingauf, J., van Bavel, E., Bakker, E. N., *et al.* (2017). Endothelial basement membrane laminin 511 is essential for shear stress response. EMBO J. 36(2): 183– 201.
- Domogatskaya, A., Rodin S., Tryggvason, R. (2017). Functional diversity of laminins. Ann Rev Cell Dev Biol. 28: 523- 553.
- Donald, W., Cockcroft, M. (2010). Direct Challenge Test. Airway Hyperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance. CHEST Supp. 138 (2): 18- 24.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. Cell Tissue Res. 339: 259- 268.
- El Husseiny's. (2018). Essentials for Respiratory System. Chapter 1 Pulmonology, embryology & anatomy. First Edition ebook. Published Middle East Libraries.
- Engler, A., Sen, S., Sweeney, H., Discher, D. (2006). Matrix elasticity directs stem cells lineage specification. Cell. 126: 677- 689.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., *et al.* (2009). Integrins in immunity. J Cell Sci. 122: 215- 225.
- Faoud, T. (2011). The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. JAOA; 111 (11) Suppl: 11- 17.
- Frantz, C., Stewart, K., Weaver, V. (2010). The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci. 123: 4195- 4200.

- Freyer, A., Johnson, S., Hall, P. (2001). Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Res Mol Biol.* 25 (5): 569- 576.
- Fuchs, B., Braun, A. (2008). Improved mouse models of allergy and allergic asthma chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets.* 9 (6): 495- 502.
- Fujita, M., Khazenzon, N., Bose, S., Sekiguchi, K., Sasaki, T., Carter, W., Ljubimov, A. (2005). Overexpression of beta 1 chain containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Can Res.* 7 (4): 411- 421.
- Gaga, M., Vignola, A., Chanez, P. (2001). Upper and lower airways: similarities and differences. *Eur Respir J.* 1 (18): 1- 16.
- Garg, M., Braunstein, G., Koeffler, H. (2014). LAMC2 as a therapeutic target for cancers. *Expert Opin Ther Tar.* 18 (9): 979-982.
- Geiger, B., Yamada, K. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spri Har Pers Biol.* 3(5).
- Gersdorff, N., Kohfeldt, E., Sasaki, T., Timpl, R., Miosge, N. (2005). Laminin 3 Chain Binds to Nidogen and Is Located in Murine Basement Membranes. *J Biol Chem.* 280: 22146-53.
- Ghezzi, C., Risse, P., Mrelli, B., Muja, N. *et al.* (2013). An airway smooth muscle cell niche under physiological pulsatile flow culture using a tubular. 34(8):1954-66.
- Godin, L., Sandri, B., Wagner, D., Meyer, C., Price, A., *et al.* (2016). Decreased laminin expression by human lung epithelial cells and fibroblasts cultured in acellular lung scaffolds from aged mice. *PLOS ONE.* 11(3).
- Grootendorst, D., Rabe, K. (2004). Mechanism of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 1: 77- 87.
- Gu, J., Fujibatashi, A., Yamada, K., Sekiguchi, K. (2002). Laminin 10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3 kinase/ AKT and MEK1 ERK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 277 (2): 19922-19928.
- Gunts, J., Tang, D. (2000). The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 15: 600- 616.
- Gunts, S., Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295: 576- 587.

- Halfer, W., Oertle, P., Monnier, C., Camenzind., Reyes, M., Hu, H., Candiello, J., *et al.* (2015). New concepts in basement membrane biology. *FEBS J.* 282:4466- 4479.
- Hamelmann, E., Schwarze, K., Takeda, A., Oshiba, G., Larson, L. (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 766- 775.
- Hamill, K., Kliggs, K., Hopkinson, S., Jones, J. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J Cell Mol Biol.* 122: 4409- 4417.
- Harburger, D., Calderwood, D. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 122: 159-163.
- Hirota, N., James, G., Martin, G. (2013). Mechanism of airway remodeling. *CHEST.* 144 (3): 1026- 1032.
- Hirts, J., Twort, C., Lee, T. (2000). Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23: 335- 344.
- Holgate, S., Davies, D., Lackie, S., Wilson, S. (2000). Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 105;193- 204.
- Howarth, P., Knox, A., Amrani, Y. (2004). Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 114: 32- 50.
- Hu, P., Lou, B. (2013). Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol.* 228: 306- 312.
- Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110(6): 673e687.
- Hynes, R. (2009). Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 161: 197.
- Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S. (2007). The requirement of the glutamic acid residue as the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins. *J Biol Chem.* 282: 1144- 11154.
- Ishihara, J., Ishihara, A., Fukunaya, K., Priscilla, S., Hubbell, A. (2018). Laminin heparin binding peptides bind growth factors and enhance diabetic wound healing. *Nat Com.* 9: 63.
- Jhonson, P., Black, J., Carlin, S., Underwood, P. (2000). The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth muscle in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 2145- 2151.

- Jia, L., Wang, R., Tang, D. (2012). Abl regulates smooth muscle cell proliferation by modulating actin dynamics and ERK1/2 activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302: 1026- 1034.
- Kadoya, Y., Yamashina, S. (1989). Intracellular accumulation of basement membrane components during morphogenesis of rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem.* 37(9):1387-92.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 3: 422- 433.
- Katayama, M., Ishizaka, A., Sakamoto, M. (2010). Laminin γ 2 fragments are increased in the circulation of patients with early phase acute lung injury. *Intensive Care Med.* 36: 479–486.
- Kawa, A., Jonson, C., Seveus, L., Miyazaki, K., Virtanen, I. *et al.* (2015). Uncoordinated production of laminin 5 chain in airway epithelium of allergic asthmatics. *Respir Res.* 6 (11): 1- 10.
- Khazenzon, N., Ljubimov, A., Lakhter, A., Fujita, M., Fujiwara, H., Sekiguchi, K. (2003). Antisense inhibition of laminin 8 expression reduces invasion of human gliomas in vitro. *Mol Cancer Ther.* 2 (19): 985- 994.
- Kianmehr, M., Ghorani, V., Hossein, M. (2016). Animal model of asthma, various methods and measured parameters: a methodological review. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 15 (6): 445- 465.
- Klominek, J., Robért, K., Karl-Gösta, S. (1993). Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: Effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res.* 53 (18): 4376-4382.
- Kluijver, J., Schrupf, J., Evertse, C., Sont, J., Roughley, P., Rabe, K. *et al.* (2015). Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy.* 35: 1361- 1369.
- Kranenburg, A., Widyastut, W., Moori, W., Stark, P., Alagappan, V., Boer, W. (2016). Enhance bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol.* 126 (5): 725- 735.
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., Aoiki, I. (2013). Pathology of asthma. *Front Micro Biol.* 4 (263): 1- 15.

- Kular, J., Basu, S., Sharma, R. (2014). The extracellular matrix: structure, composition, age related differences, tools for analysis and application for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 5: 1- 17.
- Kuo, K., Herrera, A., Wang, L. *et al.* (2013). Structure function correlation in airway smooth muscle adapted to different lengths. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285 (2): 384-390.
- Lauzon, A., Martin, J. (2016). Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *Fac Reviews.* 5: 1- 9.
- LeBleu, V., McDonald, B., Kalluri, R. (2017). Structure and function of basement membrane. *Exp Biol Med.* 232: 1121- 1129.
- Ljubimova, Y. (2004). Association between laminin 8 and glial tumor grave, recurrence and patient survival. *Cancer.* 101 (3): 604- 612.
- Lloyd, C., Robinson, D. Allergen- induced airway remodelling. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1020- 1032.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V., Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (12): 1 - 24.
- Martino, F., Perestrelo, A., Vinarsky, V., Pagliari, S., Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: from tension to function. *Front Physiol.* 9: 824.
- Mindt, B., Fritz, J., Duerr. (2018). Group 2 Innate lymphoid cells in pulmonary immunity and tissue homeostasis. *Front Immunol.* 9 (840): 1- 17.
- Miner, J., Patton, B., Lentz, S. (1997). The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol.* 137(3):685-701.
- Miner, J., Yurchenco, P. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 255-84.
- Moore, C., Winder, S. (2010). Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun & Sign.* 8 (3).
- Morales, L., Rogel, M., Eisenberg, R., J. Hamill, K., Soberanes, S., Nigdelioglu, R., Chi, M., Cho, T., Radigan, A., Ridge, M., Misharin, V., *et al.* (2015). Lung-specific loss of $\alpha 3$ laminin worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 52(4): 503–512.

- Mouw, J., Guanquing, O., Weaver, V. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15: 771- 783.
- Nagato, S. (2015). Downregulation of laminin 4 chain expression inhibits glioma invasion in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 117 (1): 41-50.
- Nagai, H., Shan, H., Okazaki, Y., Funahashi, S. *et al.* (2012). Metamorphosis of mesotelial cells with active horizontal motility in tissue culture. *Scientific Reports*; 3 (1144): 1- 7.
- Nguyen, D., Pulkkinen, L., Schlvetter, J., Meneguzzi, G., Vitto, J., Senior, R. (2006) Lung development in laminin γ 2 deficiency: Abnormal tracheal hemidesmosomes with normal branching morphogenesis and epithelial differentiation. *Resp Research.* 7 (28).
- Nguyen, D., Ward, J., Hirst, S. (2005). Beta-1 integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med.* 171: 217- 223.
- Nguyen, D., Zhou, T., Shu, J., Mao, J. (2013) Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer In Cytes.* 2(1): e.
- Nishimune, H., Sanes, J., Carlson, S. (2004). A synaptic laminin- calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature.* 432 (7017): 580- 587.
- O'Byrne, P., Inman, M. (2003). Airway hyperresponsiveness. *CHEST.* 123: 411- 416.
- Pacheco, I. (2006). 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.
- Parameswaran, K., Widyastuti, W., Alagappan, V., Radford, K., Kranenburg, A., *et al.* (2006). Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. 44 (1): 139- 146.
- Pelosi, P., Rocco, P., Negrini, D., Passi, A. (2007). The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Scien.* 79 (2): 285- 297.
- Pierce, R., Griffin, G., Miner J., Senior, R. (2000). Expression patterns of laminin alpha 1 and alpha 5 in human lung during development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23 (6): 742- 747.
- Postma, D., Timens, W. (2006). Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 3: 434- 439.

- Pozzi, A., Yurchenco, P., Lozzo, V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* 57: 1- 10.
- Prakash, Y. (2016). Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 311: 1113- 1140.
- Ramos, R., Campos, M., Martinez, E., Bazán, B., García, E. (2013). Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Exp Lung Res.* 39: 136- 145.
- Ramos, R. Patricia. (2013a). análisis de la respuesta inmune asociada al proceso inflamatorio de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Relan, N., Yang, Y., Beqaj, S., Miner, J., Schuger, L. (1999). Cell Elongation Induces Laminin $\alpha 2$ Chain Expression in Mouse Embryonic Mesenchymal Cells: Role in Visceral Myogenesis. *J Cell Biol.* 147 (6): 1341–1350.
- Ricciardolo, F., Nijkamp, F., Rose, V., Folkerts, G. (2008). The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets.* 9 (6): 452- 465.
- Roberts, C., Walker, D., Schellenberg, R. (2002). Extracellular matrix. *Clin Allergy Immunol.* 16: 143- 178.
- Rosmark, O., Ahrman, E., Müller, C., Elowsson, L., Leif, E., Malmström, A. *et al.* (2018). Quantifying extracellular matrix turnover in human lung scaffold cultures. *Nature.* 8 (5409): 1- 13.
- Ross, M., Pawlina, W. (2011). *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology.* Baltimore, USA. Lippincott Williams & Wilkins. 6th edition.
- Rousselle, P., Beck, K. (2013). Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adh Migr.* 7(1): 122-134.
- Sasaki, T., Fässler, R., Hohenester, E. (2004). Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 164 (7): 959- 963.
- Schéele, S., Nyström, A., Durbeej, M., Talts, J., Ekblom, M., Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med.* 85: 825- 836.
- Schenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, N., Khokha, R. (2003). Binding to EGF receptor of a laminin- 5 EGF- like fragment liberated during MMP dependent mammary gland involution. *J Cell Biol.* 161: 197- 204.
- Schiller, H., Fassler, R. (2013). Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell- matrix adhesions. *EMBO Rep.* 14: 509- 519.

- Schuger, L., Skubitz, A., Zhang, J., Sorokin, L., He, L. (1997). Laminin α 1 chain synthesis in the mouse developing lung: requirement for epithelial-mesenchymal contact and possible role in bronchial smooth muscle development. *J Cell Biol.* 139 (22): 553- 562.
- Schuliga, M. (2015). Smooth muscle and extracellular matrix interactions in health and disease. 360- 391
- Schuliga, M., Ong, S., Soon, I., Zal, F., Harris, T., Stewart, A. (2003). Airway smooth muscle remodels pericellular collagen fibrils: implications for proliferation. *Am J Path.* 163 (3): 1045- 1056.
- Schuger, L., O'Shea, K., Nelson, B., Varani, J. (1999). Organotypic arrangement of mouse embryonic lung cells on a basement membrane extract: involvement of laminin. *Development.* 110 (49): 1091- 1099.
- Shi, Q., Boettiger, D. (2003). A novel mode for integrin-mediated signaling tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Mol Biol Cell.* 14: 4306- 4315.
- Shifren, A., Witt, C., Christie, C., Castro, M. (2012). Mechanism of remodeling in asthmatic airways. *J Allergy.* 1- 12.
- Simon, T., Bromberg, J. (2017). Regulation of the immune system by laminin. *Trends Immunol.* 38 (11): 858- 871.
- Slats, A., Janssen, K., Van Schadewijk, A., Van der Plas, D., Schot, R., Ven den Aardweg, *et al.* (2008). Expression of smooth muscle and extracellular matrix proteins in relation to airway function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 121 (5): 1196- 1202.
- Sun, Z., Guo, S., Fassler, R. (2016). Integrin mediated mechanotransduction. *J Cell Biol.* 215: 445- 456.
- Szelachowska, J., Jelen, M., Kornafel, J. (2006). Prognostic significance of intracellular laminin and Her2/neu overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 26 (5B): 3871-6.
- Tang, D. (2015). Critical role of actin-associated proteins in smooth muscle contraction, cell proliferation, airway hyperresponsiveness and airway remodeling. *Respir Res.* 16 (134): 1- 15.
- Takahashi, S., Takahiro, H., Tatsuya, O., Sasaki, S., Taira K., Masaru K. (2002). Cytoplasmic expression of laminin gamma2 chain correlates with postoperative hepatic metastasis and poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer.* 94(6): 1894-901.

- Taube, C., Dakhama, A., Gelfand, E. (2004). Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol.* 135 (2): 173- 186.
- Tliba, O., Deshpande, D., Chen, H. (2003). IL-13 enhances agonist-avoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 140 (7): 1159- 62.
- Tliba, O., Panettieri, R. (2009). Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma. *Annu Rev Physiol.* 71: 509-35
- Tordera, P. (2004). Hiperrespuesta bronquial en el asma. *Patogenia y medicación.* *Arch Bronconeumol.* 40: 8- 13.
- Tran, T., McNeil, K., Gerthoffer, W., Unruh, H., Halayko, A. (2006). Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respir Res.* 7 (117).
- Tran, T., Teoh, C., Chun, J., Qiao, Y., Yein, C., Khuano, C., Stewart, A., Harris, T. (2013). Laminin drives survival signals to promote a contractile smooth muscle phenotype and airway hyperreactivity. *FASEB J.* 27: 3991- 4003.
- Urich, D., Eisenberg, J., Hamill, K., Takawira, D., Chiarella, S., Soberanes, S., Gonzalez, S., Koentgen, F., Manghi, T. *et al.* (2011). Lung-specific loss of the laminin $\alpha 3$ subunit confers resistance to mechanical injury. *J Cell Sci.* 124: 2927-2937.
- Vaday, G., Lider, O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: Dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leuk Biol.* 67: 149- 159.
- Vezina, A., Tremblay, M., Carbonetto S. (2017). Laminin is instructive, and calmodulin dependent kinase II is non-permissive for the formation of complex aggregates of acetylcholine receptors on myotubes in culture. *Matrix Biol.* 57 :106- 123.
- Vignola, A., Kips, J., Bousquet, J. (2000). Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 105 (6): 1041- 1053.
- Virtanen, I., Laitinen, A., Tani, T., Pääkkö, P., Laitinen, L. (1996). Differential expression of laminins and their integrin receptors in developing and adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15 (2): 184- 196.
- Vivolo, M., Bonamichi, R., Magalhaes, F., Costa, A., Kalil, J. (2017). Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy.* 10: 293- 301.
- Wang, R., Mercaitis, O., Panettieri, R., Tang, D. (2017). Raf-1 actin dynamics and Abl in human airway smooth muscles cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 48: 172- 178.

- Willem, M., Miosge, N., Halfer, W., Smyth, N., Jannett, I. (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development*. 129: 2711- 2722.
- Yamada, M., Sekiguchi, K. (2015). Molecular basis of laminin e integrin interactions. *Curr Top Mem*. 76: 1063-5823.
- Yamamoto, H., Kitadai, Y., Yamamoto, H., Oue, N., Ohdan, H., Yasui, W., Kikuchi, A. (2009). Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 137(1): 242-252.
- Yick, C., Ferreira, D., Annoni, R., Thüsen P., Kunst, W., Bel, E., Lutter, T., Mauad, P., Sterk, Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. *NIH J Glaucoma*. 23: 1- 8.
- Yick, C., Ferreira, D., Annoni, R., Thüsen, P., Kunst, W., Bel, E. Lutter, T. *et al.* (2012). Extracellular matrix in airway smooth muscle is associated with dynamics of airway function in asthma. *Allergy, Eur J Allergy Clin Immunol*. 67: 552- 559.
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. *NIH J Glaucoma*. 23: 1- 8.
- Yurchenco, P., Amenta, P., Patton, B. (2004). Basement membrane assembly stability and activities through the development. *Matrix Biol*. 22: 521- 538.
- Yurchenco, P. (2015). Integrating activities of laminins that drive basement membrane assembly and function. *Elsevier Curr Top Mem*. 76: 1- 30.
- Yurchenco, P. (2011). Basement membrane: cell scaffold and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Pers Biol*. 3 (2).
- Zhang, W., Gunts, J. (2008). Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix. Implications for contraction. *Proc Am Thorac Soc*. 5: 32- 39.
- Zhang, J., Guo, W., Wang, Y. (2014). Microtubules stabilize cell polarity by localizing rear signals. *Proc Natl Acad Sci*. 111; 16383- 16388.
- Zhou, Y., Horowitz, J., Naba, A., Ambalavanan, N., Atabai, K., Balestrini, J. *et al.* (2017). Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. *ELSEVIER Matrix Biol*. 7: 77- 104.
- Zhuang, J., Zhao, L., Gao, X., Xu, F. (2019). An advanced recording and analysis system for the differentiation of guinea pig cough responses to citric acid and prostaglandin E2 in real time. *PLOS ONE*. 14.