



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**PERFIL PROTEÓMICO DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS EN UN  
MODELO DE ASMA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. ALVAREZ GONZÁLEZ MARISOL**

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

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

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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX DICIEMBRE 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PERFIL PROTEÓMICO DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS EN UN**

**MODELO DE ASMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. ALVAREZ GONZÁLEZ MARISOL**

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

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

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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX DICIEMBRE 2023**



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)  
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0807/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de junio de 2023** 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 **ALVAREZ GONZÁLEZ MARISOL** con número de cuenta **311066614** con la tesis titulada **“PERFIL PROTEÓMICO DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS EN UN MODELO DE ASMA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. GUILLERMINA JULIANA BAAY GUZMÁN  
Vocal: DRA. VERÓNICA ESTELA CARBAJAL SALINAS  
Vocal: DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ  
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
Secretario: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de octubre de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHTEARR/rcht

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

### **Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM:**

Agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haber brindado el apoyo y la oportunidad de desarrollarme dentro de la ciencia, así como por proporcionarme las bases del conocimiento académico y formativo para la realización de este proyecto y de muchos otros que brindan un crecimiento científico, social y cultural para nuestro país.

### **Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías:**

Agradecimiento al CONAHCYT por haber brindado el apoyo económico durante los meses de duración del posgrado (apoyo CONAHCYT con num. 1034653)

### **A mi tutora:**

Agradecimiento a mi tutora, la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins por la invaluable dirección y apoyo para la realización de la tesis, brindándome la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

### **A los miembros comité tutorial:**

Agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. María Sandra Cabrera Benítez y la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval por fungir como miembros de mi comité tutorial, brindándome la guía, el apoyo y tiempo para la consolidación de la tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mis padres, Alejandro Alvarez y Soledad González y hermanos Eduardo Alvarez y Alejandro Alvarez por su apoyo incondicional, en tiempos buenos y malos, por siempre creer en mí, por el amor y el cariño que siempre me brindan. Por que, gracias a ustedes, mis metas y sueños han sido posibles. Todo esto es por y para ustedes. ¡Los amo por siempre con todo mi corazón!

Agradezco a la Dra. Blanca Bazán Perkins y a la Dra. Angélica Flores Flores, porque sin ellas esto no hubiera sido posible. Agradezco su apoyo, sus enseñanzas, sus consejos, las experiencias, su calidez humana, pero sobretodo, agradezco su presencia incondicional en momentos difíciles. Gracias a ellas pude concluir el proyecto y crecer como persona, por lo que les estaré eternamente agradecida.

A mis abuelos, que siempre están presentes guiándome en pensamiento. Cada paso que doy también es para ellos, y aunque ya no pudieron disfrutar mis logros en vida, sé que lo están haciendo desde el cielo.

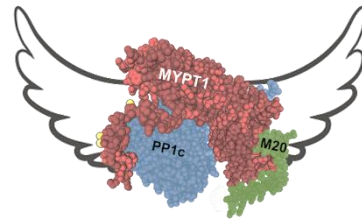
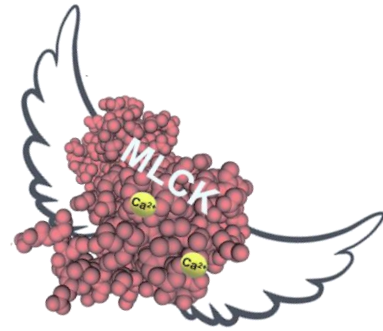
A toda la familia Alvarez González y amigos, porque siempre estuvieron ahí cuando se traba de alentarme. Están siempre en una partecita importante de mi corazón.

A todo mi laboratorio de Inmunofarmacología, compañeros y técnicos, por el apoyo brindado, por las vivencias tan gratas que formaron parte día con día. Por su inmensa amistad y cariño.

A la Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas por los conocimientos, el tiempo brindado y la ética invaluable que me brindó durante la revisión del manuscrito.

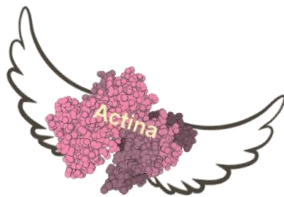
Agradezco a los miembros de mi jurado, la Dra. Guillermina Juliana Baay Guzmán, el Dr. Gabriel López Velázquez, la Dra. María Lourdes Segura y la Dra. María Sandra Cabrera Benítez por el tiempo, la paciencia y la espera durante la revisión y aprobación de la tesis, permitiéndome aprender mucho de ellos.

Agradezco al INER, por permitirme formar parte de sus instalaciones durante el tiempo de duración del posgrado en el Laboratorio de Inmunofarmacología, así como por la atención y el apoyo brindado durante el acaecimiento de la pandemia por la COVID-19.



***“Han transformado mis sueños más locos en una realidad aún más increíble que elefantes voladores. ¡Por supuesto que todas las proteínas pueden volar!, El truco consistía en dar alas a los ¡Elefantes Moleculares!”***

***John B. Fenn, Premio Nobel de Química 2002***





# ÍNDICE

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

### ABREVIATURAS

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1. Estructura de las vías aéreas.....	5
2. Asma.....	7
2.1. Definición de asma, fenotipos y comorbilidades .....	7
2.2. Epidemiología del asma.....	7
3. Principales características funcionales del asma .....	8
3.1. Hiperreactividad de las vías aéreas .....	8
3.2. Músculo liso de las vías aéreas .....	8
3.3. Contracción del músculo liso .....	9
3.4. Componentes de la matriz extracelular de las vías aéreas.....	12
3.5. Adhesiones transmembranales y estabilización de los filamentos de actina durante la fuerza contráctil .....	13
3.6. Inflamación de las vías aéreas .....	14
3.7. Remodelación de las vías aéreas .....	15
3.8. Epitelio, remodelación y MLVA .....	16
3.9. Hiperplasia e hipertrofia del músculo liso de las vías aéreas.....	17
3.10. Células potenciales, transición epitelio mesénquima.....	18
4. Proteómica e interacción.....	19
4.1. Electroforesis 1D y 2D .....	20
4.2. Espectrometría de masas: un sistema MALDI-TOF-TOF .....	21
4.3. Identificación de proteínas a partir de EM.....	22
4.4. Base de datos STRING: redes de asociación de proteínas funcionales..	23
4.5. Validación del interactoma .....	24
5. Proteoma-interactoma de las vías aéreas.....	25
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	27
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	27

<b>METODOLOGÍA</b> .....	28
1. Animales.....	28
2. Modelo de asma alérgica en cobayo .....	28
2.1. Sensibilización antigénica.....	28
2.2. Refuerzo antigénico .....	29
2.3. Retos antigénicos .....	29
3. Pletismografía barométrica para animales en libre movimiento .....	31
4. Reactividad de las vías aéreas.....	32
5. Eutanasia de animales .....	32
6. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	32
7. Espectrometría de masas.....	33
8. Construcción del proteoma-interactoma del músculo liso traqueal.....	35
9. Inmunohistoquímica en parafina.....	35
10. Análisis de expresión en el programa ImageJ-Fiji.....	36
11. Materiales .....	37
12. Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	38
1. Reactividad de las vías aéreas en cobayos del modelo de asma alérgica ....	38
2. Proteínas presentes en geles de electroforesis de una y dos dimensiones de cobayos del modelo de asma alérgica .....	39
3. Identificación de proteínas en cobayos del modelo de asma alérgica por espectrometría de masas a partir de geles de electroforesis 1D y 2D .....	41
4. Expresión de proteínas presentes en las vías aéreas de cobayos del modelo de asma alérgica.....	42
4.1. Expresión y localización de las cadenas de miosina .....	42
4.2. Expresión de isoformas de actina .....	44
4.3. Proteínas asociadas a los filamentos de actina y miosina .....	47
5. Interacción y expresión de proteínas presentes en MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica .....	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
1. Isoformas de actina .....	56
2. Proteínas relacionadas con la regulación de actinas y miosinas en el asma alérgica .....	59

3. Interacción y expresión de proteínas presentes en MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica .....	63
4. Comportamiento diferencial de las proteínas en el MLIn y MLT .....	65
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	66
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	67
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

**Figura 1.** Estructura de las vías aéreas.

**Figura 2.** Posición estructural del músculo liso de las vías aéreas.

**Figura 3.** Contracción y relajación del músculo liso.

**Figura 4.** Organización citoesquelética y submembranal de las células de músculo liso.

**Figura 5.** Proteínas que forman parte del complejo de adhesión a la membrana y MEC.

**Figura 6.** Procesos patológicos desarrollados durante la remodelación de las VA en el asma.

**Figura 7.** Modelo de activación de la hiperplasia del músculo liso de las vías aéreas a través del mecanismo de TEM.

**Figura 8.** Mapa proteómico por electroforesis 2D

**Figura 9.** Interactoma obtenido en la base de datos STRING

**Figura 10.** Modelo piramidal para la construcción y validación de interactomas.

**Figura 11.** Estructura del modelo de asma alérgica en cobayos.

**Figura 12.** Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*)

**Figura 13.** Modelo de asma alérgica en cobayos y pletismografía barométrica para animales en libre movimiento

**Figura 14.** Espectrometría de masas en sistema MALDI TOF/TOF MS/MS.

**Figura 15.** Hiperreactividad de las vías aéreas en cobayos del modelo de asma alérgica

**Figura 16.** Segmentos traqueales y bandas identificadas por electroforesis de una dimensión (1D)

**Figura 17.** Análisis de expresión de proteínas presentes en cobayos del modelo de asma alérgica por electroforesis 2D

**Figura 18.** Expresión de tinción relativa y localización de MYH11 en tejido traqueal e intrapulmonar.

**Figura 19.** Expresión de tinción relativa y localización de MYL9 en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 20.** Expresión de tinción relativa y localización de ACTG1 en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 21.** Expresión de tinción relativa y localización de ACTB en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 22.** Expresión de tinción relativa y localización de ACTA2 en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 23.** Expresión de tinción relativa y localización de FLNA en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 24.** Expresión de tinción relativa y localización de TAGLN en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 25.** Expresión de tinción relativa y localización de RG1 en tejido traqueal e intrapulmonar

**Figura 26.** Interacción de proteínas de la maquinaria contráctil presente en el MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica

**Figura 27.** Interacción y regulación de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina a través de sus subunidades reguladoras

**Cuadro 1.** Anticuerpos monoclonales utilizados para IHC

**Cuadro 2.** Proteínas identificadas en tejido traqueal de cobayos del modelo de asma alérgica

## ABREVIATURAS

<b>ACTA2</b>	Actina alfa de músculo liso
<b>ACTB</b>	Actina beta citoplasmática
<b>ATG1</b>	Actina gamma citoplasmática
<b>Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub></b>	Ion calcio intracelular
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CAV1</b>	Caveolina 1
<b>CAVIN1</b>	Cavina 1
<b>CAVIN2</b>	Cavina 2
<b>CAVIN3</b>	Cavina 3
<b>CMM</b>	Células madre mesenquimales
<b>DP<sub>200</sub></b>	Dosis provocativa 200
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>EP</b>	Epitelio
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
<b>FLNA</b>	Filamina A
<b>GINA</b>	Iniciativa Global para el Asma
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>HRH1</b>	Receptor de histamina 1
<b>HVA</b>	Hiperreactividad de las vías aéreas
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL3</b>	Interleucina 3
<b>ILK</b>	Cinasa ligada a integrinas
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>IPP</b>	Interacción proteína-proteína
<b>ITGB1</b>	Integrina β1
<b>LP</b>	Lámina propia
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz

<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MHC</b>	Cadena pesada de miosina
<b>MLC</b>	Cadena ligera de miosina
<b>MLC20</b>	Cadena ligera de miosina de 20 kDa
<b>MLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
<b>MLIn</b>	Músculo liso intrapulmonar
<b>MLT</b>	Músculo liso traqueal
<b>MLVA</b>	Músculo liso de las vías aéreas
<b>MS/MS</b>	Espectros en tándem
<b>MYH11</b>	Cadena pesada (gruesa) de miosina
<b>MYL9</b>	Cadena ligera (delgada) de miosina
<b>MYPT1</b>	Subunidad reguladora de la fosfatasa 1
<b>MYPT1-Thr696</b>	Forma fosforilada de la subunidad reguladora de la fosfatasa 1 en el residuo de treonina 696
<b>MYPT1-Thr850</b>	Forma fosforilada de la subunidad reguladora de la fosfatasa 1 en el residuo de treonina 850
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipasa 1 subunidad $\beta$
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PP1c<math>\beta</math></b>	Subunidad catalítica de la fosfatasa 1 c $\beta$
<b>PXN</b>	Paxilina
<b>RG1</b>	Subunidad reguladora de la fosfatasa 1 dirigida al glucógeno
<b>ROCK1</b>	Isoforma 1 de la cinasa asociada a la proteína Rho
<b>ROCK2</b>	Isoforma 2 de la cinasa asociada a la proteína Rho
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>SERCA</b>	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida
<b>SSF</b>	Solución salina fisiológica
<b>STRING</b>	<i>Functional protein association networks</i>

<b>TAGLN</b>	Transgelina
<b>TEM</b>	Transición epitelio mesénquima
<b>TGF-β1</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>Th17</b>	Linfocitos helper tipo 17
<b>Th2</b>	Linfocitos helper tipo 2
<b>TLN1</b>	Talina
<b>TOF</b>	Analizador por tiempo de vuelo
<b>VA</b>	Vías aéreas
<b>α-SMA</b>	Alfa actina de músculo liso



## RESUMEN

**Introducción:** El análisis proteómico aplicado en varias enfermedades crónicas, incluida el asma, ha permitido comprender y dilucidar el papel de múltiples proteínas y marcadores biológicos implicados en el comportamiento de diversos procesos y vías de señalización, tales como la contracción muscular. Una de las características más importantes en el asma es la presencia de una contracción sostenida y aumentada del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) en respuesta a casi cualquier estímulo contráctil, también llamada hiperreactividad de las vías aéreas (HVA). Diversas proteínas han sido relacionadas con el aumento de la HVA en el asma, tales como la activación de la cinasa asociada a RhoA/Rho (ROCK), la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) o la inhibición de la enzima fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). Sin embargo, actualmente no ha sido posible clarificar la vía de señalización y las proteínas clave que se relacionen con un aumento de la contracción del MLVA observada en la HVA que se presenta durante una crisis de asma.

**Objetivo:** Por todo lo anterior, el objetivo de esta tesis fue analizar el perfil proteómico del músculo liso de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayos, para determinar la presencia, expresión e interacción de las principales proteínas relacionadas con el incremento de la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

**Metodología:** Se empleó un modelo de asma alérgica en cobayos con cinco etapas de exposición a la ovoalbúmina (OVA). A partir de tejido traqueal de cobayos control y del modelo de asma alérgica se realizó electroforesis de una y dos dimensiones, seguido de la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (EM) en sistema MALDI-TOF/TOF MS/MS. Se evaluó la reactividad de las vías aéreas en respuesta a la histamina, además de un análisis de expresión relativa en el programa ImageJ-Fiji de las proteínas previamente identificadas por EM y observadas mediante inmunohistoquímica (IHC). Se generó un interactoma en el programa STRING a partir de las expresiones proteicas analizadas por IHC y otras proteínas evaluadas en investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo.

**Resultados:** Las electroforesis de una y dos dimensiones revelaron bandas con pesos moleculares de 17-230 kiloDaltones. El análisis proteómico MALDI/TOF-TOF MS/MS identificó 27 proteínas en los mapas proteómicos del grupo control y modelo de asma alérgica. El análisis de IHC de MYH11 en músculo liso intrapulmonar (MLIn), músculo liso traqueal (MLT) y lámina propia traqueal (LP) no mostró diferencias. Es la primera vez que se detecta MYH11 fuera de la célula muscular, posiblemente por liberación de exosomas. MYL9 fue encontrada en MLIn y MLT, con incremento significativo en MLIn, lo que la relaciona con el incremento de la contracción en el asma alérgica. ACTG1 se observó en MLIn, MLT, LP y epitelio, con disminución en MLIn, también se identificó en células ciliadas y

polimorfonucleares. ACTB aumentó en MLIn y MLT, relacionándose con la rigidez por formación de filamentos submembranales. ACTA2 se identificó solo en MLIn y MLT, incrementando en MLIn, indicando un papel central con el aumento de la contracción. FLNA fue encontrada en MLIn, MLT y LP, incrementando en MLT; su papel en regulación de contracción es incierto, pero podría interactuar con integrina  $\beta 1$ . TAGLN presente en MLT y MLIn sin diferencias significativas, probablemente no es crucial en el aumento de contracción en asma. RG1 identificada e incrementada en MLIn, MLT y LP, posiblemente esté relacionada con la inhibición de relajación del MLVA en asma, además, su localización extracelular posiblemente sea junto a gránulos de glucógeno. El interactoma sugiere que CAV1, CAVIN 1,2 y 3 podrían mediar la expresión de ITGB1, HRH1 y ACTB en MLVA. Incremento de ACTB, ACTA2 e ITGB1 indica rigidez celular excesiva por complejos de adhesomas y un fenotipo hipercontráctil. PXN, TLN1 e ILK disminuyen en asma. ROCK2 podría regular contracción por inhibición de MLCP, por disminución de ACTG1 y por activación de RG1. TGFB1 interactúa con proteínas clave de maquinaria contráctil. El análisis IHC destaca diferencias de expresión y localización entre tejido traqueal e intrapulmonar.

**Conclusiones:** La expresión de MYH11 no necesariamente se vincula con el aumento de la contracción en el asma. Es la primera vez que se observa MYH11 fuera de la célula del MLVA, posiblemente liberada por exosomas. La mayor expresión de MYL9 en el MLIn y su posible fosforilación por ROCK2 podrían intensificar la contracción en el asma. El incremento de ACTB y ACTA2 podría relacionarse con mayor filamentogénesis de actina, aumentando la rigidez por filamentos submembranales e interacción con acto-miosina. El aumento de FLNA podría estabilizar filamentos de actina, especialmente ACTB y ACTA2; el mecanismo de "shedding" podría ubicar FLNA en el espacio extracelular con integrina  $\beta 1$ . TAGLN no parece crucial para la contracción en el asma. RG1 aumentado en MLVA del modelo de asma indica un papel importante al inhibir la desfosforilación de las cadenas ligeras de miosina, con localización extracelular posiblemente vinculada a gránulos de glucógeno. El interactoma sugiere que CAV1, CAVIN 1,2 y 3 podrían incrementar ITGB1, HRH1 y ACTB en asma. TGFB1 podría mediar la expresión de proteínas contráctiles. Las proteínas en tejido traqueal e intrapulmonar tienen distinta localización y expresión, enfatizando evaluar previamente el comportamiento de la proteína a trabajar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Proteomic analysis applied in various chronic diseases, including asthma, has enabled us to the role of multiple proteins and biological markers involved in various processes and signaling pathways, like the muscle contraction. One of the most important features of asthma is the presence of sustained and increased contraction of the smooth muscle of the airways (MLVA) in response to any contractile stimulus, defined as airway hyperresponsiveness (AHR). Various proteins have been associated with the increased HVA in asthma, for example, activation of RhoA/Rho-associated kinase (ROCK), myosin light chain kinase (MLCK), or the inhibition of myosin light chain phosphatase (MLCP) enzyme. However, it has not been possible to clarify the signaling pathway and the principal proteins related to the increased MLVA contraction observed in HVA during an asthma crisis.

**Objective:** The objective of this thesis was to analyze the proteomic profile of the smooth muscle of the airways in an allergic asthma model in guinea pigs to determine the presence, expression, and interaction of the main proteins related to the increased contraction of the smooth muscle of the airways.

**Methodology:** Allergic asthma model in guinea pigs with five stages of exposure to ovalbumin (OVA) was employed. One- and two-dimensional electrophoresis was carried out on tracheal tissue from control guinea pigs and the allergic asthma model, followed by protein identification using mass spectrometry (EM) in a MALDI-TOF/TOF MS/MS system. Airway reactivity to histamine was evaluated, and relative expression analysis of the proteins identified by EM and observed through immunohistochemistry (IHC) was performed using the ImageJ-Fiji program. An interactome was generated in the STRING program based on the protein expressions analyzed by IHC and other proteins evaluated in previous research by our working group.

**Results:** One- and two-dimensional electrophoresis revealed bands with molecular weights ranging from 17 to 230 kiloDaltons. Proteomic analysis using MALDI/TOF-TOF MS/MS identified 27 proteins in the proteomic maps of the control group and the allergic asthma model. IHC analysis of MYH11 in intrapulmonary smooth muscle (MLIn), tracheal smooth muscle (MLT), and tracheal lamina propria (LP) showed no differences. It is the first time that MYH11 has been detected outside of the muscle cell, possibly through exosome release. MYL9 was found in MLIn and MLT, with a significant increase in MLIn, indicating association with increased contraction in allergic asthma. ACTG1 was observed in MLIn, MLT, LP, and epithelium, with a decrease in MLIn, and was also identified in ciliated and polymorphonuclear cells. ACTB increased in MLIn and MLT, and was relating to cell stiffness due to submembranous filament formation. ACTA2 was identified only in MLIn and MLT, increasing in MLIn, indicating a central role in increased contraction. FLNA was found in MLIn, MLT, and LP, with an increase in MLT; its role in contraction regulation

is uncertain but could interact with integrin  $\beta$ 1. TAGLN was present in MLT and MLIn without significant differences. RG1 was identified and increased in MLIn, MLT, and LP, possibly related to the inhibition of MLVA relaxation in asthma, and its extracellular location may be associated with glycogen granules. The interactome suggests that CAV1, CAVIN 1, 2, and 3 could mediate the expression of ITG $\beta$ 1, HRH1, and ACTB in MLVA. The increase of ACTB, ACTA2, and ITGB1 indicates excessive cell stiffness due to adhesome complex formation and a hypercontractile phenotype. PXN, TLN1, and ILK decrease in asthma. ROCK2 could regulate contraction by inhibiting MLCP, decreasing ACTG1, and activating RG1. TGFB1 interacts with important contractile machinery proteins. IHC analysis highlights differences in expression and localization between tracheal and intrapulmonary tissue.

**Conclusions:** The expression of MYH11 does not necessarily link to increased contraction in asthma. It is the first time that MYH11 has been observed outside the MLVA cell, possibly released by exosomes. The higher expression of MYL9 in MLIn and you potential phosphorylation by ROCK2 could intensify contraction in asthma. The increase in ACTB and ACTA2 may be related to increased actin filament formation, leading to stiffness due to submembranous filaments and interaction with actomyosin. The increase in FLNA could stabilize actin filaments, especially ACTB and ACTA2; the "shedding" mechanism could place FLNA in the extracellular space with integrin  $\beta$ 1. TAGLNA does not seem crucial for contraction in asthma. The increased RG1 in MLVA in the allergic asthma model indicates an important role in inhibiting the dephosphorylation of myosin light chains, with extracellular localization possibly linked to glycogen granules. The interactome suggests that CAV1, CAVIN 1, 2, and 3 could increase ITGB1, HRH1, and ACTB in asthma. TGFB1 may mediate the expression of contractile proteins. Proteins in tracheal and intrapulmonary tissue have different localization and expression, emphasizing the need to evaluate the protein's behavior beforehand.

# INTRODUCCIÓN

## **1. Estructura de las vías aéreas**

La respiración pulmonar ha sido definida como un proceso continuo que implica un mecanismo de ventilación, el cual describe el movimiento del aire hacia adentro y hacia afuera de los pulmones, inspiración y espiración respectivamente, seguido por un mecanismo de perfusión y difusión tisular por el que se realiza el intercambio gaseoso alveolar en donde el dióxido de carbono difunde hacia los alveolos y el oxígeno (O<sub>2</sub>) hacia la sangre, siendo ésta última transportada hacia los tejidos del organismo para la entrega del O<sub>2</sub> (Baynes, 2019). El tracto respiratorio se encuentra dividido en dos componentes principales, la zona de intercambio de gases presente en los alveolos, y la parte conductora proporcionada por las vías aéreas (VA). A su vez, las VA se encuentran divididas en VA superiores, incluyendo a las cavidades nasales, orales, la laringe y la faringe, mientras que las vías aéreas inferiores se componen de la tráquea, bronquios, bronquiolos y alveolos (Fig. 1) (Effros, 2006; Ball et al., 2021).

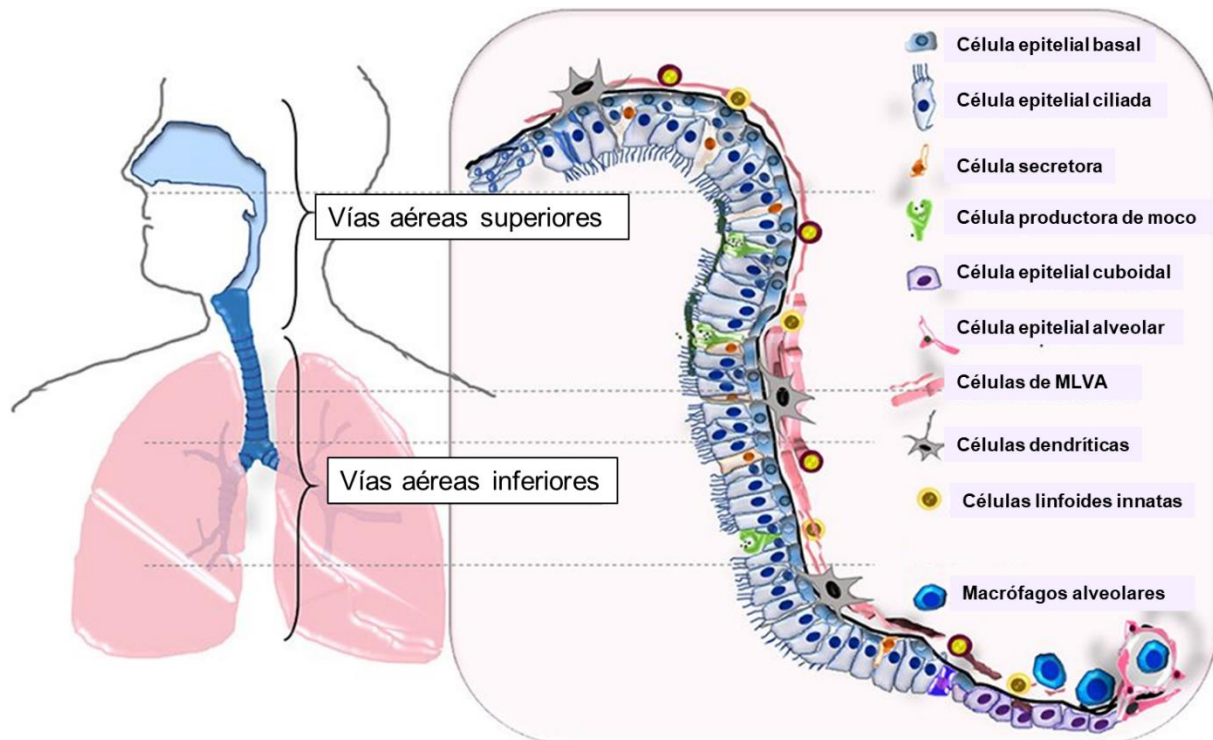
La principal funcionalidad de las VA es conducir el flujo de aire externo hacia las superficies respiratorias, dando paso al intercambio gaseoso durante la respiración. Sin embargo, las VA también pueden fungir como barrera contra variaciones de temperatura, humedad y de protección a infecciones por patógenos invasores (Ball et al., 2021).

Estructuralmente, las VA pueden ser divididas en regiones conductoras, las cuales comprenden tejido cartilaginoso que va desde la tráquea hasta la 10<sup>a</sup> generación de las ramificaciones bronquiales, y las regiones respiratorias o no cartilaginosas, que van desde los bronquios más pequeños, hasta los bronquiolos terminales (Wittekindt, 2017). Las VA cartilaginosas están conformadas por un epitelio ciliado pseudoestratificado, glándulas submucosas y células caliciformes productoras de moco, mientras que, las VA no cartilaginosas comprenden, en su mayoría, un epitelio cilíndrico cúbico no ciliado y en la parte más distal, en dirección alveolar, se identifica una ausencia de células caliciformes (Fig. 1) (Wittekindt, 2017; Mindt et al., 2018; Crystal et al., 2008). Además, algunos de los componentes de la barrera epitelial, como son la presencia de células inmunes posicionadas a lo largo de las VA, tales como las células dendríticas, los linfocitos y los macrófagos alveolares, son esenciales para su funcionamiento (LeMessurier et al., 2020). Inmediatamente por debajo del epitelio de las VA, se posiciona la membrana basal, seguida de una lámina propia, la cual integra parte de las glándulas submucosas, tejido conjuntivo, cartílago y músculo liso de las vías aéreas (MLVA) (Figura 1), que, en conjunto, reciben el nombre de capa fibromusculocartilaginosa (Welsch, 2008).

En la región más distal de los últimos bronquiolos respiratorios, se organizan los sacos alveolares que comprenden a los alveolos, estructuras con forma de vesículas en las cuales sucede el intercambio de gases respiratorios (Welsch, 2008). Dicho intercambio respiratorio también es regulado por la irrigación

sanguínea, ya que, siempre y cuando los vasos sanguíneos abastezcan a las VA de un flujo sanguíneo suficiente, podrá darse paso al mecanismo de respiración (Hislop 2002).

En los pulmones, los vasos sanguíneos que irrigan a las VA se ramifican junto con ellas, desde estructuras gruesas, hasta estructuras con diámetros menores. A través de estos vasos sanguíneos, el pulmón recibe sangre sistémica que nutre las paredes de las VA, y, en el lecho capilar, se encargan de suministrar y drenar sangre dentro de la pared alveolar, regulando el suministro de oxígeno y dióxido de carbono (Hislop 2002).



**Figura 1. Estructura de las vías aéreas.** Vías aéreas superiores e inferiores. Células epiteliales, células secretoras, células del MLVA y células inmunes forman parte de la barrera epitelial que recubre el lumen de las VA. Epitelio ciliado pseudoestratificado que se modifica a un epitelio cúbico simple no ciliado. Células secretoras y productoras de moco posicionadas a lo largo del epitelio de las VA. Por debajo del epitelio de las VA se posiciona la lámina propia compuesta por tejido conjuntivo y células de MLVA. *Imagen tomada y modificada de LeMessurier et al. 2020.*

Las VA pueden estar sujetas a diferentes afecciones que van desde enfermedades leves u ocupacionales, como los resfriados, hasta enfermedades crónicas, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el cáncer de pulmón o el asma (Chronic Respiratory Diseases, 2008).

## **2. Asma**

### *2.1. Definición de asma, fenotipos y comorbilidades*

El asma es una enfermedad que ha incrementado a nivel mundial en los últimos años en casi todos los grupos de edad, y que, a pesar de ello, las estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad siguen siendo un desafío para la medicina (Reddel et al., 2022). En general, el asma es definida por la variación y duración de diversos patrones de síntomas que la caracterizan, por lo que una sola definición para la enfermedad resulta limitada (Reddel et al., 2022). Sin embargo, la Global Initiative for Asthma (GINA), ha definido al asma como una enfermedad heterogénea usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las VA definida a su vez por la historia de los síntomas respiratorios que se presentan, tales como sibilancias, opresión en el pecho, dificultad para respirar, tos y limitación variable del flujo de aire espiratorio, las cuales varían en tiempo e intensidad (GINA, 2022).

Diversos fenotipos del asma han sido identificados a partir de las características que se evalúan durante los métodos de diagnóstico clínico, incluidas las diferentes comorbilidades presentes en los pacientes con asma, las cuales incluyen rinitis, sinusitis, la enfermedad por reflujo gastroesofágico, trastornos hormonales, apnea del sueño, obesidad, entre otros (Boulet and Boulay, 2011; GINA, 2022). Tales fenotipos considerados por la GINA incluyen al asma alérgica, asma no alérgica, asma de inicio en la edad adulta o de inicio tardío, asma persistente con limitación del flujo de aire, y el asma asociada a la obesidad (GINA, 2022), los cuales generalmente pueden asociarse con la presencia de hiperreactividad de las VA (HVA) y de la variación de la inflamación, pero que no resultan ser factores necesarios o suficientes para diagnosticar la enfermedad (Reddel et al., 2022).

### *2.2. Epidemiología del asma*

El asma es generalmente considerada una enfermedad de inicio temprano, ya que suele presentarse en la infancia o en la juventud. Sin embargo, puede ser diagnosticada a cualquier edad. Un ejemplo de lo anterior es la prevalencia estimada del 7% en adultos mayores de 65 de años, similar a la que se presenta en adultos jóvenes de 18-34 años (Wu et al., 2019).

A nivel mundial, se puede identificar que la prevalencia del asma se presenta diferencialmente dependiendo del sexo, siendo más alta en mujeres (10.4%), que en hombres (6.2%). De igual forma, diversos factores se encuentran estrechamente relacionados con la incidencia del asma, incluidos los factores económicos, en donde la pobreza representa la mayor incidencia con un valor del 11.8%, o factores étnicos, siendo la etnia hispana la que representa la mayor incidencia con un valor de 14.9% comparada con la etnia africana, la cual cuenta con una incidencia del 10.2% (Wu et al., 2019).

### **3. Principales características funcionales del asma**

#### **3.1. Hiperreactividad de las vías aéreas**

El mecanismo funcional más importante que caracteriza al asma corresponde a la HVA, definida como la respuesta excesiva de las VA a casi cualquier estímulo contráctil, induciendo una broncoconstricción exagerada de las VA (Lauzon and Martin, 2016; Chapman and Irvin, 2015; Meurs et al., 2008). La HVA no se limita a ser característica única del asma, ya que puede ser inducida incluso en pacientes sanos o estar presente en otras enfermedades tales como la EPOC y la fibrosis quística, en donde, observamos una broncoobstrucción debido al desarrollo de HVA e hiperproducción de moco (Berend et al., 2008). A pesar de la importancia que requiere el análisis de la regulación de la HVA, los mecanismos aún no se comprenden (Berend et al., 2008).

Una de las pruebas mayormente utilizadas en humanos para el análisis y diagnóstico de la HVA corresponde a la exposición de diferentes agentes directos estimulantes de los receptores presentes en el MLVA, tales como la histamina o metacolina, los cuales inducen una contracción de manera casi inmediata evaluada a través de la caída del 20% del volumen espirado forzado en el primer segundo ( $FEV_1$ ). La disminución del  $FEV_1$  en respuesta a una determinada dosis del agente contráctil administrado, comparada con el  $FEV_1$  observado al inicio de la prueba antes de administrar el agente directo identifica la presencia de HVA en el paciente (Cockcroft et al., 1997).

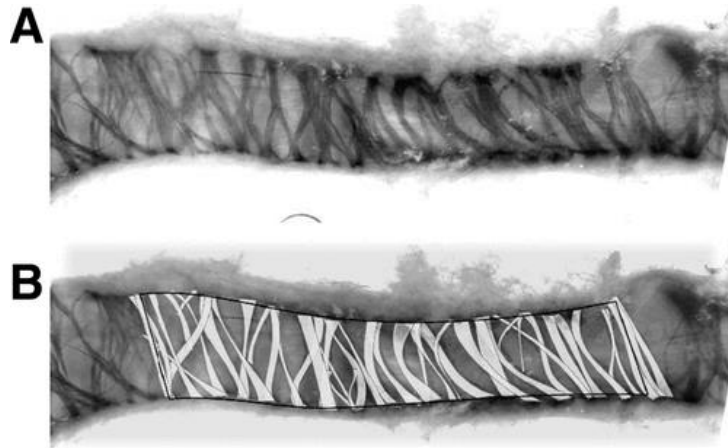
Debido a que la estimulación de la broncoconstricción observada en la HVA es directamente relacionada con el MLVA, diversos estudios han identificado al MLVA como el principal regulador de la HVA en el asma, así como del aumento de la gravedad de la enfermedad, dirigiendo las investigaciones hacia la funcionalidad y fisiología del MLVA (Ijpm et al., 2017).

#### **3.2. Músculo liso de las vías aéreas**

El músculo liso puede ser considerado tónico o fásico dependiendo de las propiedades contráctiles que presente. Los músculos lisos fásicos, como los que se identifican en el íleon, el colon, el útero y la vena porta, generan potenciales de acción que conducen a pequeñas contracciones espontáneas de corta duración, mientras que, los músculos lisos tónicos localizados en las VA y en el esfínter no generan potenciales de acción ni contracciones espontáneas, pero mantienen la contracción durante periodos de tiempo más prolongados (Wang et al., 2021; Gunst, 2012). De manera general, las VA presentan contracción basal del MLVA por efecto del tono intrínseco controlado por condiciones humorales y neuronales (Álvarez-Santos et al., 2020).



El MLVA es considerado un componente importante de las VA (Berair R. et. al, 2013) y se encuentra posicionado a lo largo de la banda traqueal y de forma helicoidal a partir de las estructuras bronquiales (Fig. 2) (Ijpm et al., 2017; Gunst, 2012).



**Figura 2. Posición estructural del músculo liso de las vías aéreas.** A. Corte de un fragmento de las vías aéreas de humano. Se observa la posición helicoidal del músculo liso de las vías aéreas. B. Misma muestra del fragmento de las vías aéreas de humano, resaltando los haces del MLVA en color blanco. *Imagen tomada de Ijpm et al., 2017.*

A nivel funcional, el MLVA ha tenido un papel controversial, ya que diversos estudios lo consideran indispensable para el mantenimiento del tono bronquial, así como para los mecanismos mecánicos de la ventilación pulmonar, mientras que otros investigadores se refieren al MLVA como un músculo vestigial, sin una función específica, similar al músculo del apéndice intestinal (Berair et al., 2013). Sea cual sea la funcionalidad que se le adjudique, el MLVA resulta ser el factor más importante durante el evento de HVA en el asma (Álvarez-Santos et al., 2020).

### 3.3. Contracción del músculo liso

La maquinaria contráctil se encuentra formada por filamentos de actina y miosina que se entrelazan entre sí, con la finalidad de generar la fuerza de contracción localizada en el citoesqueleto del MLVA (Bourke et al., 2022; Li et al., 2020; Álvarez-Santos et al., 2020).

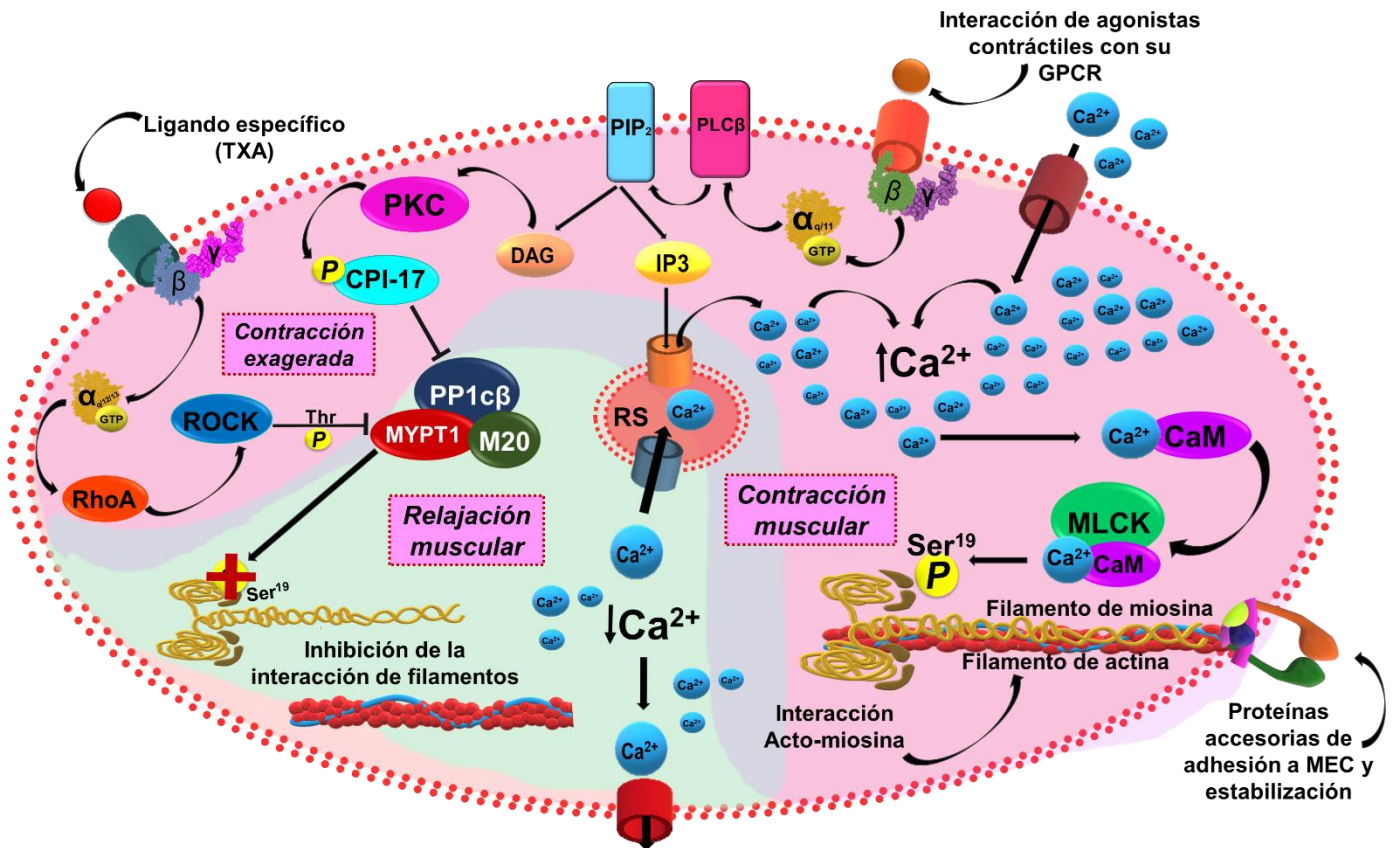
En el músculo liso, los filamentos de actina son muy abundantes, mientras que los filamentos de miosina se encuentran en menor cantidad. Las cadenas de miosina comprenden dos grupos principales de proteínas, las cadenas pesadas de miosina (MHC por “Myosin heavy chain”) que se encargan de la formación del cuerpo de los filamentos gruesos de miosina y las cadenas ligeras de miosina (MLC por “myosin

light chain”) que forman parte del cuello en el filamento grueso. Dichos cuellos de miosina son consolidados por dos tipos de pares de MLC, con pesos moleculares diferentes de 17 kDa y 20 kDa, siendo éstas últimas denominadas cadenas reguladoras de miosina de 20 kDa o MLC20 (Bourke et al., 2022; Álvarez-Santos et al., 2020; Deng et al., 2011; Gao et al., 2001).

De manera general, la contracción del músculo liso es inducida por una gran variedad de receptores, agonistas y estímulos mecánicos que tienen como objetivo el incremento de las concentraciones de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) ya sea por entrada del ion desde el espacio extracelular o por liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el retículo sarcoplásmico (RS) (Fig. 3). El RS es un organelo considerado uno de los principales reservorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , el cual, a través de la presencia de diferentes receptores, tales como el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, el receptor de rianodina o la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (SERCA), regula la entrada o salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que le permite a su vez, regular diferentes vías de señalización celular. (Ouédraogo and Roux, 2014; Kudo et al., 2013; Webb, 2003).

Existen diferentes estímulos contráctiles que pueden detonar la activación del mecanismo de contracción, tales como los agonistas adrenérgicos, neurotransmisores, hormonas, ecosanoides o ésteres de forbol (Allen and Walsh, 1994; Somlyo and Somlyo, 2000), los cuales generan respuestas dependientes de la interacción con su receptor acoplado a un determinado tipo de proteína G (receptores GPCRs) (Billington and Penn, 2003). La interacción por parte de agonistas contráctiles como acetilcolina, histamina o metacolina, con sus GPCRs asociados a proteínas G/q11 en el músculo liso, activan una vía de señalización mediada por la enzima fosfolipasa C ( $\text{PLC}\beta$ ). La  $\text{PLC}\beta$  puede hidrolizar diferentes fosfolípidos presentes en la membrana celular, incluyendo al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ). La hidrólisis del  $\text{PIP}_2$  desencadena la formación de 1,2-diacilglicerol (DAG) e Inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). La liberación de  $\text{IP}_3$  hacia el citosol conlleva a la interacción con su receptor específico presente en el RS, incrementando la liberación  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo anterior genera un incremento del  $\text{Ca}^{2+}_i$ , el cual, al unirse a la proteína calmodulina (CaM), satura los sitios de unión a CaM formando el complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Dicho complejo, se une a la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK por “Myosin light chain kinase”), activando su función, incrementando la fosforilación de la MLC20 en su residuo de Ser<sup>19</sup>. (Li et al., 2020; Vetterkind and Morgan, 2012; Deng et al., 2011). La fosforilación por parte de la MLCK incrementa las interacciones entre los componentes de acto-miosina en el citoesqueleto; además la activación de la ATPasa de miosina permite el desplazamiento continuo de los filamentos durante la contracción. De esa forma, la interacción de acto-miosina junto con el reclutamiento de proteínas accesorias en el citoesqueleto y en el espacio submembranal, generan el acortamiento de la célula muscular lisa durante la contracción (Tang, 2015). De manera contraria, la activación del mecanismo de relajación se induce a partir de la disminución del  $\text{Ca}^{2+}_i$ , ya sea por recapturación del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RS o por liberación al espacio extracelular

a través de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo anterior, induce la inactivación de la MLCK, dando paso a la activación de la holoenzima denominada fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP por "Myosin light chain phosphatase"), enzima responsable de inducir la relajación del músculo liso a través de la desfosforilación del residuo de  $\text{Ser}^{19}$  de la MLC20 (Touyz et al., 2018; Sanderson et al., 2008) (Fig. 3).



**Figura 3. Contracción y relajación del músculo liso. Contracción muscular.** Diversos agonistas contráctiles activan a los receptores GPCRs activando la vía de señalización de la  $\text{PLC}\beta$ . El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por liberación del RS y por entrada desde el espacio extracelular, activa a la cinasa MLCK encargada de fosforilar a la MLC20 en su residuo de  $\text{Ser}^{19}$ , activando la interacción entre los filamentos de acto-miosina durante la contracción. **Relajación muscular.** La disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por recapturación en el RS o liberación al espacio extracelular, activa a la fosfatasa MLCP encargada de desfosforilar a la MLC20, induciendo la inhibición de la interacción entre los filamentos de acto-miosina durante el mecanismo de relajación. **Inhibición de MLCP.** El mecanismo de PKC activa CPI-17 que inhibe a  $\text{PP1c}\beta$ , mientras que ligandos como tromboxano (TXA) activan GPCRs que activan la vía de señalización RhoA-ROCK. *Imagen propia basada en Liu and Khalil, 2018; Touyz et al., 2018; Lacolley et al., 2017; Tang, 2015; Matthew et al., 2004, Deng et al., 2001, Allen and Walsh, 19994; Somlyo and Somlyo, 2000 and Billington and Penn, 2003.*

La MLCP se encuentra constituida por tres subunidades, una subunidad reguladora de la fosfatasa 1 (MYPT1), subunidad catalítica  $1c\beta$  denominada PP1 $c\beta$  y una subunidad pequeña M20, los cuales resultan ser blancos importantes para la inhibición de su función e incremento exagerado de la contracción (Chang et al., 2018; Álvarez-Santos et al., 2020). Por un lado, el DAG resultante de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, puede generar la activación de la proteína cinasa C (PKC), encargada de fosforilar a CPI-17, potente inhibidor directo de la subunidad catalítica PP1 $c\beta$  (Fig.3) (Somlyo and Somlyo, 2000). Mientras que, la activación de la vía de señalización mediada por la proteína G pequeña RhoA y la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK), inducen una inhibición de MYPT1 mediada por la fosforilación dada principalmente en residuos de treonina (Fig. 3) (Álvarez-santos et a., 2020).

En el asma, principalmente durante el incremento de la HVA, la exacerbación de la contracción del MLVA resulta ser contundente para el aumento de la limitación del flujo de aire, razón por la cual, es la anormalidad funcional que ha sido mayormente estudiada y que ha generado mayor interés de enfoques terapéuticos (Donovan et al., 2020). Además, no solo la contracción en el citoesqueleto ha resultado interesante durante el incremento de la HVA, puesto que la transmisión de la fuerza a través de complejos submembranales y transmembranales en el MLVA, así como el incremento del depósito de matriz extracelular (MEC) ha resaltado el interés por estudiar el componente mecánico de la contracción muscular (Zhang and Gunst, 2008).

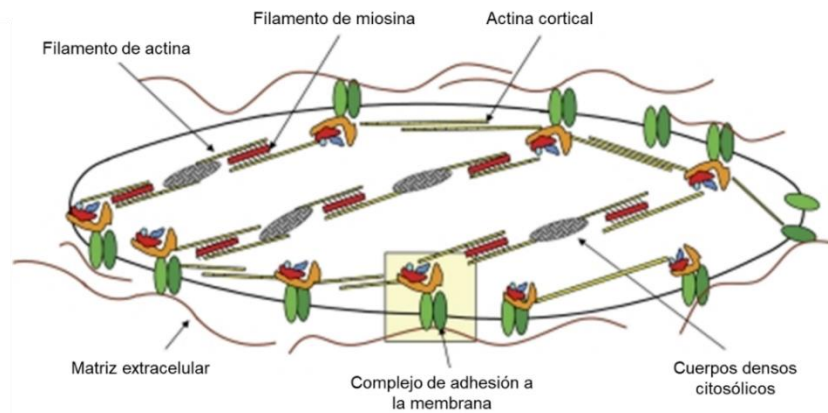
#### *3.4. Componentes de la matriz extracelular de las vías aéreas*

El depósito de MEC, principalmente en estructuras como la lámina propia, la membrana basal reticular y la submucosa, también contribuye al estrechamiento excesivo de las VA (Barnes and Gorin, 2011; Hough et al., 2020). La MEC se compone principalmente de proteínas fibrosas, tales como colágena o elastina, así como de proteínas y glicoproteínas como la fibronectina, tenasina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas que constituyen las adhesiones celulares (Ng et al., 2019; Olczyk et al., 2014; Holgate, 2008). Las fibras de colágena tipo I-XI son los componentes más abundantes de la MEC y el incremento de las mismas genera un aumento de la rigidez pulmonar, mientras que las proteínas de adhesión celular, tales como la fibronectina, son importantes para la interacción con diversos receptores, incluidas las integrinas (Black et al., 2003).

El incremento de la MEC, forma parte del censado extracelular de las células de MLVA, principalmente por estar unidas a proteínas conocidas como integrinas, formando parte del andamiaje de complejos de adhesión importantes para la activación de mecanismos de migración, proliferación y contracción celular. Dichos complejos de adhesión comprenden una gran cantidad de proteínas que se acoplan a la membrana plasmática, así como proteínas que se unen y estabilizan directamente filamentos de actina (Ng et al., 2019; Hough et al., 2020).

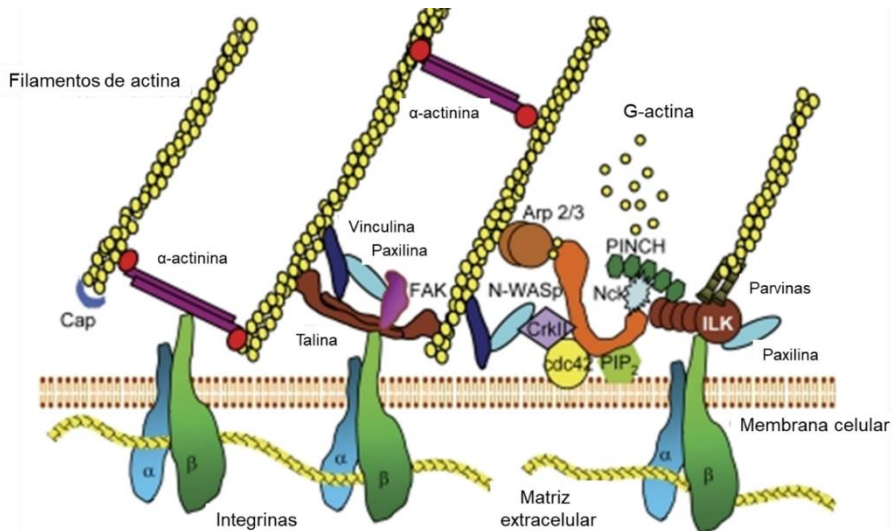
### 3. 5. Adhesiones transmembranales y estabilización de los filamentos de actina durante la fuerza contráctil

La remodelación del citoesqueleto forma parte fundamental de la contracción del músculo liso, principalmente, la polimerización de los filamentos de acto-miosina (Tang, 2015). Durante la contracción, las células del MLVA a menudo son sometidas a cambios estructurales, trayendo consigo interacciones de transmisión de la fuerza mecánica y contráctil por parte de los componentes del citoesqueleto, principalmente de los filamentos de actina, hacia las proteínas que conforman los andamiajes de adhesión a la membrana, formando complejos macromoleculares junto con los dominios citoplasmáticos de las integrinas, que a su vez transmiten la señal a sus proteínas ligando-específicas presentes en la MEC (Fig. 4) (Zhang and Gunst, 2008).



**Figura 4. Organización citoesquelética y submembranal de las células de músculo liso.** Interacción de filamentos de acto-miosina unidos a cuerpos densos citosólicos. Formación de los adhesomas que se unen a los filamentos de actina citoesquelética y cortical que transmiten la señal hacia los componentes de la MEC. *Imagen tomada y modificada a partir de Zhang and Gunst 2008.*

Las integrinas transmembranales en el músculo liso, son proteínas localizadas en placas densas que conectan los componentes de la MEC con el citoesqueleto de actina, además de ser partícipes en el mecanismo de migración celular de muchos tipos celulares incluidas las células del MLVA. Junto con las integrinas, otras proteínas citoplasmáticas de andamiaje, tales como  $\alpha$ -actinina, vinculina, paxilina, FAK y talina, por mencionar algunas, regulan la activación de la contracción y la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto y de la actina cortical (Fig. 5) (Tang, 2015; Zang and Gunst, 2008).



**Figura 5. Proteínas que forman parte del complejo de adhesión a la membrana y MEC.** Proteínas de adhesomas y accesorias que se unen directamente a los filamentos de actina provenientes del citoesqueleto de acto-miosina y a los segmentos citoplasmáticos de las proteínas transmembranales integrinas, las cuales, transmiten señales intracelulares hacia la MEC. *Imagen tomada y modificada a partir de Zhang and Gunst 2008.*

Además de la presencia de los filamentos de actina y de miosina en el citoesqueleto de músculo liso, la localización de una serie de proteínas de unión a actina, son importantes para la estabilización y transmisión de la fuerza mecánica. Entre dichas proteínas se encuentran las proteínas caldesmona, telokina, tropomiosina, CaM, entre otras. Todas estas proteínas, ejercen acción sobre la regulación de la interacción de acto-miosina y por lo tanto regulan a su vez, la contracción del músculo liso (Davuluri et al., 2010).

A pesar de su participación durante el incremento de la HVA en el asma, el MLVA también ha sido considerado un músculo liso secretor de moléculas que regulan la inflamación. Durante la respuesta inflamatoria, la interacción del MLVA con algunas de las proteínas inflamatorias pequeñas conocidas como citocinas, provenientes de células inmunes, pueden desencadenar tanto el reclutamiento de linfocitos T, eosinófilos y monocitos como la estimulación proliferativa del MLVA, incrementando la respuesta contráctil en el asma. Por lo anterior, la relación contracción-inflamación, es un tema relevante para el entendimiento del mecanismo contráctil en la enfermedad (Hough et al., 2020; Halwani et al., 2013; Kudo et al., 2013).

### 3.6. Inflamación de las vías aéreas

En un inicio, la inflamación de las VA en el asma, se encuentra restringido a las VA meramente conductoras del flujo de aire, pero conforme avanza la gravedad de la enfermedad, el infiltrado inflamatorio puede observarse en las VA pequeñas y en los sectores alveolares (Holgate, 2008).

El desarrollo del asma, comúnmente ha sido relacionado con la exposición a una cantidad de alérgenos comunes, incrementando el desarrollo de alergias que detonan un sinnúmero de respuestas inflamatorias. Inmunológicamente, los alérgenos inhalados, tales como el polen, los ácaros del polvo doméstico u hongos, por mencionar algunos, generan una respuesta de activación y diferenciación de las células linfocíticas, hacia linfocitos helper tipo 2 (Th2) (Kudo et al., 2013; Finkelman et al., 2010) La inflamación tipo Th2 asociada a la sensibilización por alérgenos, se ha relacionado con el montaje de una respuesta inflamatoria a través de la secreción de las interleucinas IL-4 e IL-13, provocando una respuesta relacionada con el incremento en el recuento de eosinófilos. Sin embargo, el tipo de respuesta que se presenta en el asma, no se limita a una respuesta Th2, ya que, en el asma grave, se ha identificado una diferenciación de los linfocitos hacia otros linajes, tales como los linfocitos helper tipo 17 (Th17), productores de IL-17A, IL-17F e IL-22. A diferencia de la respuesta Th2, la respuesta Th17 ha sido relacionada con un incremento en el reclutamiento de neutrófilos, característica importante dentro del asma neutrofílica grave (Doe et al., 2010; Zhou et al., 2005; Chakir et al., 2003)

Las células inflamatorias reclutadas durante el desarrollo de la respuesta inmune, tales como los eosinófilos, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y mastocitos no solo incrementan la inflamación, si no que se han relacionado estrechamente con el incremento de la contracción del MLVA y la HVA (Alwarith et al., 2020).

Diversas investigaciones han sugerido que, las citocinas liberadas durante la respuesta inflamatoria, tales como el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), no solo incrementan el reclutamiento de células inflamatorias, sino que inducen respuestas directas en el epitelio de las VA, relacionadas con la producción de moco y con la metaplasia de células caliciformes, así como con la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos, induciendo a su vez, la secreción de proteínas de MEC, tales como fibronectina y colágena (Huo et al., 2021; Ng et al., 2019; Yang et al., 2012). A medida que la inflamación de las VA es persistente, se presenta una serie de cambios estructurales notables en las VA que forman parte del componente de remodelación de las VA en el asma, el cual contribuye en gran medida al aumento de la fisiopatología de la enfermedad (Ng et al., 2019; Holgate, 2008).

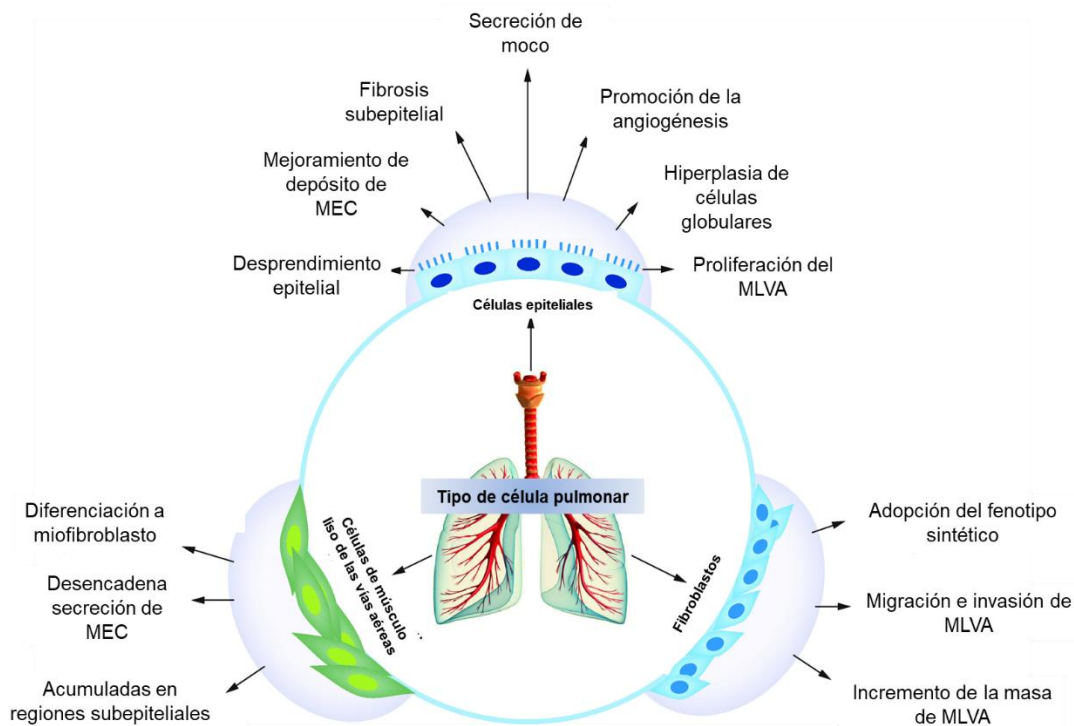
### *3.7. Remodelación de las vías aéreas*

La remodelación de las VA en el asma, es una característica que conlleva al cambio estructural, composición, contenido y organización de los constituyentes moleculares y celulares de las mismas, contribuyendo con la obstrucción del flujo de aire a través de la estimulación de la contracción del MLVA. Específicamente, la remodelación de las VA en el asma, engloba un conjunto de procesos estructurales alterados (Fig. 6), tales como el depósito excesivo de MEC, ruptura del epitelio de



las VA e hiperplasia (incremento celular) e hipertrofia (cambio de tamaño celular) de MLVA y músculo liso vascular, por mencionar algunos, los cuales han sido relacionados con el incremento de la cronicidad de la enfermedad (Dhanjal et al., 2022; Fang et al., 2020; Jong et al., 2005).

La acumulación excesiva y exagerada de la MEC genera cambios en las VA que contribuyen no sólo a la remodelación de las VA, sino que se relaciona con el incremento de la HVA y con la activación de la hiperplasia e hipertrofia del MLVA (Barnes and Gorin, 2011; Hough et al., 2020). Además de lo anterior, ésta acumulación de MEC, también ha sido relacionada con otros procesos celulares, incluida la activación del epitelio de VA en respuesta a diferentes tipos de estrés, incrementando el depósito de componentes fibróticos (Swartz et al., 2001).



**Figura 6. Procesos patológicos desarrollados durante la remodelación de las VA en el asma.** Remodelación de las VA en tres tipos de células pulmonares: Células epiteliales, Fibroblastos y células de MLVA. *Imagen tomada y modificada a partir de Dhanjal et al., 2022.*

### 3.8. Epitelio, remodelación y MLVA

El epitelio de las VA es considerada una estructura bien definida, formada por una población heterogénea de células agrupadas mediante uniones estrechas, encargadas de participar como primera defensa contra agentes patógenos o ambientales tóxicos (Malavia et al., 2009; Breeze and Wheeldon, 1977). El epitelio de las VA también participa en diversos procesos celulares, tales como la motilidad



ciliar, el transporte de iones y la secreción de mucosa. Además, es secretor de diversos mediadores y activadores importantes para las respuestas inmunológicas y fisiológicas, dentro de los que se encuentran algunos factores inhibidores de prostanoïdes, el óxido nítrico, metabolitos del ácido araquidónico, endotelinas, citocinas y factores de crecimiento (Spina, 1998). Entre los factores de crecimiento más importantes secretados por el epitelio de las VA se encuentra el factor TGF- $\beta$ , el cual es capaz de interactuar con algunas células aledañas, tales como los fibroblastos presentes en la lámina propia, induciendo la secreción y acumulación de componentes de MEC, principalmente las colágenas tipo I, III y V, fibronectina y algunas enzimas metaloproteinasas, como la MMP-9 (Davies et al., 2003; Swartz et al., 2001).

Por otro lado, el epitelio de las VA puede tener influencia en el comportamiento del MLVA, a través de la secreción de mediadores solubles que son transportados a través de la lámina propia hacia el MLVA, tales como la prostaglandina E<sub>2</sub>, endotelina 1, IL-6, IL-8, entre otros (Malavia et al., 2009; Barnes, 1998). Dichos mediadores pueden incrementar la contracción del MLVA teniendo un papel esencial en el incremento de la bronco-constricción en diversas enfermedades, como el asma. Sin embargo, diversas investigaciones dejan la interrogante del incremento de la contracción por parte del epitelio de las VA, ya que, por el contrario, apuntan a que el epitelio de las VA puede generar un decremento de la sensibilidad de contracción del MLVA en respuesta a sólo algunos agentes contráctiles, tales como la histamina o acetil colina, a través de un mecanismo de atenuación por barreras de difusión (Spina, 1998; Iriarte et al., 1990; Holroyde, 1986).

A pesar de la contrariedad de la contracción del MLVA, el papel que juega el epitelio en la proliferación MLVA ha sido más aceptado, ya que la secreción de factores de crecimiento como PDGF, EGF y IGF-1 por parte del epitelio, tienen influencia en los mecanismos de hiperplasia e hipertrofia del MLVA (Lan et al., 2018).

### *3.9. Hiperplasia e hipertrofia del músculo liso de las vías aéreas*

El aumento de la masa del MLVA en el asma, es una de las características más importantes de la remodelación de las VA que en la mayoría de los casos puede inferir la gravedad de la enfermedad, así como la cronicidad de la inflamación (Fig. 6) (Hough et al., 2020; Boxall et al., 2006).

La hiperplasia e hipertrofia del MLVA en el asma resultan ser dominantes y significativos, sin embargo, el origen o la activación del mecanismo sigue siendo controversial. Estas dos características del MLVA probablemente aumenten su capacidad de contracción durante una crisis de asma, observándose principalmente en pacientes que presentan una etapa de la enfermedad clínicamente grave y mortal

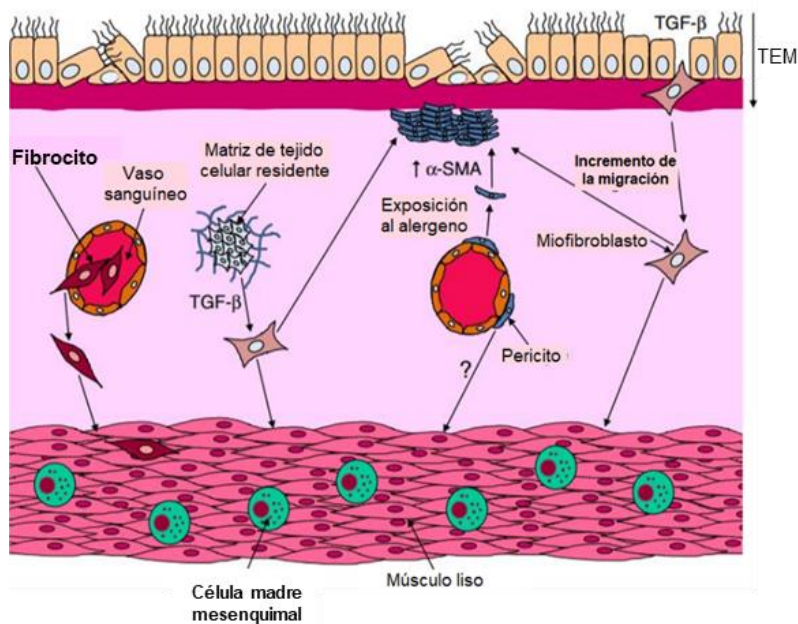
(James et al., 2012). Diversos investigadores concuerdan que las células del MLVA pueden generar un fenotipo proliferativo que pueda desencadenar el aumento de la masa del MLVA. Sin embargo, otros estudios apuntan al reclutamiento de células diferentes a las del MLVA, que se diferencian en células musculares lisas, tales como fibrocitos, células madre y células progenitoras mesenquimales multipotentes (Kudo et al., 2013; Berair et al., 2013).

### *3.10. Células potenciales, transición epitelio mesénquima*

Los progenitores potenciales de las células del MLVA pueden ser localizados dentro de las VA o migrar a través de la sangre periférica circulante, hasta ser diferenciadas a un fenotipo de células mesenquimales a través de un mecanismo conocido como transición epitelio mesénquima (TEM) (Kudo et al., 2013; Berair et al., 2013).

En la sangre periférica, los fibrocitos han sido las únicas células diferenciadas por el mecanismo TEM, hacia células miofibroblásticas, consideradas importantes en la remodelación de las VA en el asma (Fig. 7) (Dhanjal et al., 2022; Berair et al., 2013). Dicha transición de fibrocitos-miofibroblasto es orquestada por la pérdida de marcadores hematopoyéticos y ganancia de marcadores mesenquimales, como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), mecanismos inducidos por el incremento de la expresión de TGF- $\beta$ , endotelina-1 o por procesos de interacción con señales provenientes de la MEC (Berair et al., 2013; kudo et al., 2013).

Por otro lado, las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotenciales que cuentan con la capacidad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares que residen en diversos tejidos, tales como el tejido conectivo, importantes en funciones de mecanismos de reparación y regeneración celular. Principalmente en el pulmón, las CMM también forman parte de las células que dan paso a los miofibroblastos, por medio de la expresión de diversos mediadores, incluido el TGF- $\beta$  (Berair et al., 2013; Boxall et al., 2006). De igual forma, las células de músculo liso que envuelven el endotelio en las VA conocidas como pericitos, forman parte de un tercer tipo celular que ha sido considerado importante en la hiperplasia del MLVA (Berair et al., 2013), sin embargo, dicho mecanismo aún sigue siendo incierto (Fig. 7). Al igual que los fibrocitos, tanto CMM como los pericitos, expresan mayormente marcadores mesenquimales como  $\alpha$ -SMA. Finalmente, todas las células diferenciadas a miofibroblastos, de una u otra forma, culminan en la diferenciación hacia células del MLVA, incrementando la gravedad de la respuesta bronco-obstructiva en el asma (Fig. 7) (Berair et al., 2013; Barnes and Gorin, 2011).



**Figura 7. Modelo de activación de la hiperplasia del músculo liso de las vías aéreas a través del mecanismo de TEM.** Los fibrocitos, las CMM y los pericitos son diferenciados hacia células miofibroblásticas, a través del TEM. A su vez, el miofibroblasto puede diferenciarse en células del MLVA. *Imagen tomada y modificada a partir de Berair et al., 2013.*

Por todo lo anterior, es claro que, lo que respecta al estudio de las vías de señalización y mecanismos tanto celulares como fisiopatológicos en el asma, es necesario no sólo analizar una proteína en particular, sino el conjunto del proteoma presente principalmente en las estructuras que se involucran directamente con la obstrucción de las VA, tales como el MLVA. Con lo anterior, técnicas elaboradas han permitido llevar a cabo estudios proteómicos que han sido pieza clave en el análisis de múltiples enfermedades, dilucidando información esencial dentro del macroambiente de proteínas y mediadores de muchos tipos celulares (Petelski et al., 2021)

#### **4. Proteómica e interacción**

Las células presentes en diversos tipos de tejidos, incluido el MLVA, han sido sometidas al análisis de diferentes enfoques ómicos, tales como la transcriptómica y la proteómica, los cuales han permitido dilucidar una gran cantidad de información para el entendimiento de la expresión de múltiples genes y proteínas individuales (Petelski et al., 2021). Sin embargo, la participación de una proteína en cualquier mecanismo o vía de señalización, depende de la interacción dada con otras proteínas, por lo que el análisis de las redes de interacción proteína-proteína (IPP) resulta ser indispensable dentro del estudio de diversas patologías, incluida el asma (Bell et al., 2022).

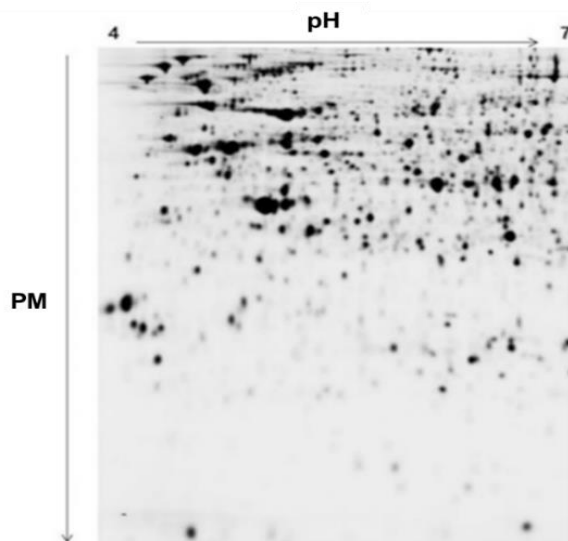
Muchos de los estudios de IPP están basados en los mapeos de identificación e interacción física entre las proteínas presentes en un sistema de señalización, a través de métodos que cuantifican y purifican miles de proteínas individuales, tales

como las técnicas de electroforesis en gel bidimensional (2D), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), matrices de proteínas, técnicas de separación por afinidad o marcado y técnicas de espectrometría de masas (EM). Siendo la electroforesis 1D y 2D, junto con la espectrometría de masas, las técnicas mayormente utilizadas para el análisis de IPP (Swan et al., 2013).

#### 4.1. Electroforesis 1D y 2D

La técnica de electroforesis 2D en gel de poliacrilamida es una técnica de separación y purificación que ha sido utilizada para el análisis de diferentes tipos de muestras, incluyendo tejidos, líneas celulares y fluidos, tales como la saliva y el suero sanguíneo. A pesar de lo anterior, la electroforesis en 2D, ha presentado diversas limitantes de uso debido a la baja eficacia de separación de proteínas poco abundantes, sin embargo, resulta ser una técnica de fácil uso, con alta reproductividad y económicamente accesible (Meleady, 2011).

En general, los métodos de electroforesis se enfocan en la separación de proteínas, siendo la electroforesis unidimensional (1D) la encargada de generar una serie de bandajes a partir del peso molecular (PM) específico de cada proteína. Contrario a lo anterior, la electroforesis 2D, está definida por dos dimensiones. En la segunda dimensión, las proteínas son sometidas a una separación por gradiente de pH, lo que permite que sean separadas a partir del estado en donde su carga neta es igual a cero, es decir, se encuentran en su punto isoeléctrico (pI), seguida de la separación de la primera dimensión, en donde las proteínas son separadas en función del PM que presentan, es decir, se realiza una electroforesis 1D. Al final de la electroforesis 2D, se obtiene un gel que contiene el mapa proteómico de la muestra a analizar, el cual, identifica una serie de puntos que corresponden a proteínas que presentan un pI y un PM específico (Fig. 8) (Meleady, 2018).



**Figura 8. Mapa proteómico por electroforesis 2D.** Representación de un gel obtenido a partir de electroforesis 2D. Se observa un gradiente de pH que va de pH=4 a pH=7 y una línea vertical del lado izquierdo que corresponde al peso molecular (PM) que va de mayor peso molecular hacia menor peso molecular, de abajo hacia arriba. Se identifican una serie de puntos con un pI y PM específico que forman en conjunto un mapa proteómico. *Imagen tomada y modificada a partir de Meleady 2018.*

A partir de los métodos de separación y purificación como la electroforesis 2D, es indispensable el análisis e identificación de cada punto proteico obtenido en los estudios del proteoma, para lo cual, las técnicas de EM, resultan ser la forma más sencilla y menos costosa para identificar la mayor cantidad de proteínas (Swan et al., 2013).

#### *4.2. Espectrometría de masas: un sistema MALDI-TOF-TOF*

Las técnicas de detección de alto rendimiento han sido indispensables en los últimos años, tanto para la identificación de compuestos dentro de la industria y la farmacología, como para la identificación de biomarcadores en la medicina personalizada, teniendo como herramientas tecnológicas diversas técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), extracción en fase sólida (SPE) y EM (Haslam et al., 2016).

Los mecanismos de proteómica a partir del análisis por EM se basan en cargar electromagnéticamente las moléculas presentes de la muestra a analizar, con la finalidad de cambiar su estado de la materia, desde fase sólida o líquida a fase gaseosa, midiendo con una mayor precisión su relación masa/carga ( $m/z$ ) a través de las trayectorias que presentan en un campo eléctrico estático y dinámico detectadas por diferentes tipos de analizadores de masas. Los analizadores de masas más populares son el analizador por cuádruplo, la trampa de iones, la transformada de Fourier y el tiempo de vuelo. Específicamente, el analizador por tiempo de vuelo (TOF) relaciona el tiempo que necesitan los iones de la muestra para viajar dentro del campo eléctrico, hasta que son detectados (Walther and Mann, 2010).

Debido a que las proteínas completas son difíciles de identificar a partir de EM, la mayoría de las técnicas requiere analizar los péptidos de las mismas, producto de digestiones previas, ya sean por procedimientos mecánicos o enzimáticos. Lo anterior ha sido necesario para el análisis espectral que se obtiene al final de la EM (Paizs and Suhai, 2005). De esa forma, los fragmentos peptídicos arrojan espectros conocidos como espectros MS o espectros en tándem (MS/MS), los cuales se pueden observar a través de histogramas con picos “señal”, en donde cada pico corresponde a la identificación de un aminoácido específico presente en la muestra (Swan et al., 2013). Una vez obtenidos los datos MS/MS, es necesario realizar un último paso para la identificación de las proteínas por EM. A partir de la información peptídica del espectro, se utiliza un software de búsqueda que contenga una base de datos de secuencias de proteínas descritas para comparar la información previa y finalmente identificar a la proteína completa (Cottrell, 2011).

Existen diversos métodos de EM que han tomado valor dentro de las técnicas más utilizadas para la identificación de proteínas, éstos incluyen la técnica de ionización

por electropulverización, la técnica de ionización por desorción y la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (Swan et al., 2013).

La técnica de EM de TOF con MALDI (MALDI-TOF-MS), es un sistema de alto rendimiento que puede analizar muestras con diferencias de tiempo en subsegundos, utilizando un componente adicional de matriz orgánica (Knizner et al., 2022). La función principal de la matriz, es absorber con mayor eficiencia la radiación láser proporcionando una mejor ionización de la muestra al proveerla de protones, evitando en mayor medida su descomposición durante el proceso (Tsuchida et al., 2020).

El tipo de matriz orgánica que se utilice dependerá de la muestra a analizar, tratando de obtener la mayor eficiencia posible. Para la identificación de péptidos, es recomendable utilizar una matriz de ácido-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), mientras que, para analizar proteínas completas, se ha utilizado una matriz a base de ácido sinapínico, para el análisis de glicanos una mezcla de ácido-2,5-dihidroxibenzoico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (Super-DHB) y para la identificación de moléculas de DNA, la matriz compuesta por ácido 3-hidroxipicolínico ha resultado ser la mejor opción (Ng et al., 2014). Una vez que se ha identificado el tipo de matriz correcta, la muestra se transfiere a la matriz, la cual seguidamente será sometida a radiación láser dentro del espectrómetro de masas, para ser posteriormente secada, ionizada y lanzada a través del TOF, obteniendo finalmente los datos MS/MS, los que serán analizados para la identificación (Tsuchida et al., 2020).

#### *4.3. Identificación de proteínas a partir de EM*

Los picos identificados en los histogramas de los espectros MS/MS requieren ser analizados a través de dos métodos principales. A grandes rasgos, el primer método consiste en el análisis directo de la intensidad observada en el histograma, así como de la repetición de picos que se presentan en el mismo, mientras que el segundo método puede aplicar un análisis a través de softwares de búsqueda para la identificación de las secuencias de proteínas, o bien, recurrir a técnicas de cuantificación de proteínas, ya sea en análisis posteriores a la obtención de los histogramas o por medio de análisis que dependen del etiquetado previo de las muestras durante la EM (Swan et al., 2013).

La comparación de la cuantificación relativa de los componentes proteicos obtenidos por EM, ha sido una herramienta que ha permitido el análisis diferencial de complejos de proteínas entre varios grupos de estudio, por ejemplo, muestras experimentales y muestras control. Una de las técnicas mayormente utilizadas hoy en día para cuantificar las proteínas por EM, es la alineación de diferentes espectros en tándem con el fin de calcular la diferencia de la intensidad relativa identificada durante cada corrida. De esta manera, el análisis posterior resulta ser más sólido

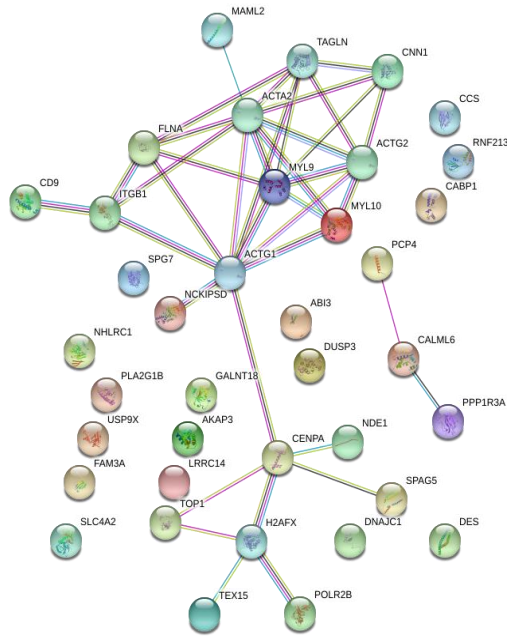
cuando se trata de comparar la presencia, ausencia, incremento o decremento de una proteína dentro de los grupos experimentales (Walther and Mann, 2010).

Una vez concluido el análisis de identificación de proteínas, la interacción entre las mismas puede llevar a obtener información acerca del papel biológico que presenta dentro del sistema o tejido del cual fueron obtenidas. Éste mecanismo de interacción es conocido como “interactoma”, el cual es obtenido a partir del análisis de los datos de interacción física y biológica que se encuentran en las principales bases de datos, agrupados por medio de diversos softwares o plataformas de interacción, tales como SPRING, STRING o SeQ (Bell et al., 2022). Dichas plataformas computacionales de interacción, toman en cuenta las similitudes entre secuencias de proteínas, la composición y similitud estructural, así como métodos de aprendizaje automático, lo cuales consisten en analizar las características de las secuencias de aminoácidos para aplicar algoritmos que permitan predecir coeficientes de correlación de interacciones de proteínas (Bell et al., 2022).

#### *4.4. Base de datos STRING: redes de asociación de proteínas funcionales*

La base de datos STRING es una plataforma dedicada a la búsqueda de interacción de genes y proteínas que tiene como objetivo entrelazar redes a partir de los análisis funcionales y estructurales de las proteínas (Von Mering et al., 2005).

Las interacciones predichas en el programa STRING se generan a partir de diversos datos almacenados en la plataforma, dentro de los cuales se incluyen (i) las interacciones experimentales conocidas presentes en bases de datos primarias, (ii) los datos de vías de interacción procedentes de bases de datos primarias, (iii) los resúmenes de Medline, un servicio de bibliotecas de información para identificar vínculos estadísticos y/o semánticos entre proteínas, (iv) algoritmos genómicos específicos y análisis de coexpresión para predecir interacciones de *novo* y (v) relaciones de ortología precalculadas para correlacionar interacciones entre organismos diferentes. Cada uno de los puntos anteriores se reflejan en el interactoma final a través de líneas de diversos colores que ejemplifican cada punto de obtención de los datos (Fig. 9) (Szklarczyk et al., 2015). El empleo del programa STRING para la predicción de un interactoma específico de células, tejidos u organismos tiene diversas ventajas en comparación con otras bases de datos, ya que, primeramente, permite mapear varios tipos de evidencia o puntos de bases de datos, conjuntarlos y relacionarlos facilitando el análisis comparativo. En segundo lugar, las interacciones que han sido comprobadas mediante procesos experimentales, son complementadas mediante los sistemas de predicción, teniendo una cobertura mayor de la red de interacción.



**Figura 9. Interactoma obtenido en la base de datos STRING.** Ejemplo del interactoma obtenido en la plataforma STRIGN. Las líneas marcadas con diferentes colores corresponden a los diversos métodos de identificación de la interacción. *Imagen propia generada en el programa STRING online.*

En tercer lugar, brinda un sistema numérico de puntuación y confianza de interacción, lo que ofrece menor margen de error. Finalmente, facilita los estudios evolutivos entre organismos diferentes, por medio de la transferencia de información relacionada con el mapeo de genes y proteínas (Von Mering et al., 2005).

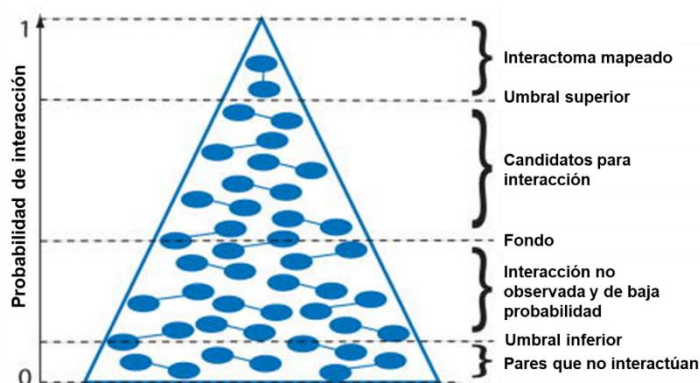
#### 4.5. Validación del interactoma

El análisis de proteínas a través de mapas o redes de interacción proteómica obtenidos a partir de bases o plataformas de datos continuamente ha requerido ser sometido a una determinación de cobertura proteica y tasas de error, con el fin de identificar que tanto se asemeja a la realidad biológica (Wodak et al., 2009).

En primera instancia, las comparativas entre los interactomas obtenidos y la literatura, suele ser un mecanismo suficiente para aceptar la interacción, sin embargo, la mayoría de las interacciones generadas de *novo* mediante predicciones, suelen requerir un análisis más profundo a través de técnicas moleculares inmunoelectroforéticas, de localización celular o inmunohistoquímicas (Wodak et al., 2009). A pesar de lo anterior, mapeos de modelos de cobertura por pares de proteínas que pueden o no interactuar, han implicado modelos piramidales que permiten estimar estadísticas de falsos negativos y falsos positivos aceptando o discriminando interacciones proteína-proteína. Dichos mapeos suelen ser parte del análisis realizado por las plataformas de redes de asociación de proteínas. Estos modelos piramidales evalúan la probabilidad de interacción



proteica a través de discriminación de probabilidades de la siguiente manera: en la base de la pirámide, por debajo del umbral inferior, se encuentran los pares de proteínas que generan puntajes con baja probabilidad de interacción, mientras que, en el segmento del fondo piramidal, son agrupadas aquellas proteínas que presentan una baja o nula probabilidad de interacción. De forma ascendente, por debajo del umbral inferior se agrupan las proteínas que presentan un valor de probabilidad mayor, las cuales son consideradas aptas para una posible interacción, a partir de éstas se generará en última instancia el interactoma, posicionándolas finalmente en el pico del modelo piramidal (Fig. 10) (Schwartz et al., 2009).



**Figura 10. Modelo piramidal para la construcción y validación de interactomas.** Agrupación de proteínas dependientes de la probabilidad de interacción. La discriminación proteica que se genera durante el análisis hasta la culminación del interactoma mapeado. *Imagen tomada y modificada de Schwartz et al., 2009*

### 5. Proteoma-interactoma de las vías aéreas

Sin duda, el análisis de interacción de proteínas ha permitido revolucionar aspectos importantes de funcionalidad, estructura, señalización y expresión de diversas proteínas y genes participes en el desarrollo de múltiples enfermedades, así como identificar posibles marcadores biológicos y dianas farmacológicas de diversos tipos celulares, incluyendo el MLVA en el asma (Mauri et al., 2014; Schwartz et al., 2009).

Muchos han sido los enfoques proteómicos que se han realizado para el MLVA en el asma, englobando investigaciones dirigidas hacia diversas vías de señalización. Un ejemplo de lo anterior, han sido los trabajos realizados para el análisis del proteoma del MLVA intrapulmonar y traqueal de pacientes sanos y pacientes con asma crónica a través de la identificación de algunas de las proteínas presentes en los miocitos humanos (Ijpma et al., 2020). De la misma forma, los proteomas-interactomas han permitido estudiar proteínas individuales y su relación con diferentes mecanismos de regulación, biomarcadores y estructuras, tanto en modelos animales, tales como el modelo de asma alérgica en ratón (Ren et al., 2021) como en biopsias bronquiales de pacientes con asma severa (Mauri et al., 2014). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se han realizado para mapear la mayor cantidad de proteínas del MLVA en el asma y la relación que podrían tener dentro de la fisiopatología de la enfermedad, aún se requieren estudios que puedan relacionar los interactomas con la regulación de la contracción del MLVA, la HVA, la remodelación de las VA y la interacción farmacológica (Ijpma et al., 2020).

## JUSTIFICACIÓN

El asma es una de las enfermedades crónicas pulmonares con mayor incidencia a nivel mundial. Diversos modelos experimentales han tratado de asemejar un sinnúmero de aspectos fisiopatológicos que se presentan en el asma humana, siendo el cobayo, uno de los animales con mayor utilidad dentro de los modelos experimentales de asma.

Diversos grupos de investigación se han dedicado al estudio de las principales características del asma, dentro de las que se encuentran la HVA y la remodelación de las VA. Siendo el mecanismo que conlleva al incremento de la contracción del MLVA, una de las principales interrogantes. Si bien, dichas investigaciones han avanzado a lo largo de los años, la expresión e interacción de las proteínas del MLVA en el asma, sigue siendo incierto.

Es notable la importancia del mecanismo de contracción del MLVA en el asma, ya que forma parte de la principal anomalía fisiológica de la enfermedad. Con ello surge la interrogante de estudiar el papel de las proteínas involucradas en la contracción del MLVA, no de forma individual, sino en conjunto, dentro del complejo de un perfil proteómico, con la finalidad de identificar el papel y la interacción de cada una de ellas en las vías de señalización que conllevan a un incremento de la contracción del MLVA en el asma. Está claro que dichos mecanismos aún son confusos, por lo que el estudio de la relación entre las proteínas del MLVA, no sólo de aquellas que se han relacionado con la interacción de acto-miosina en el citoesqueleto, sino también, aquellas proteínas que estabilizan al aparato contráctil de actina, las que forman parte de los complejos de andamiaje transmembranales y las proteínas presentes en la MEC durante la remodelación de las VA, podrían ayudar a dilucidar mecanismos de regulación y desregulación del MLVA en el asma.

Por lo anterior, en el presente estudio, se analizó la expresión e interacción de diversas proteínas identificadas por espectrometría de masas en el MLVA, con el objetivo de dilucidar el perfil proteómico presente en el músculo liso traqueal (MLT) y músculo liso intrapulmonar (MLIn) de un modelo de asma alérgica en cobayo. De esta forma, se pretende estudiar las posibles vías y mecanismos de señalización implicados en el incremento de la contracción sostenida y la remodelación de las VA, no sólo desde el estudio individual de una proteína, sino desde la perspectiva de un complejo de interacción proteómica.

## **HIPÓTESIS**

La contracción del músculo liso de las vías aéreas en el asma alérgica estará regulada por el incremento, decremento e interacción de las proteínas expresadas en las vías aéreas, principalmente de las proteínas relacionadas con el aparato contráctil y con componentes de adhesión a la membrana plasmática.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el perfil proteómico del músculo liso de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayos, para determinar la presencia, expresión e interacción de las principales proteínas relacionadas con la contracción del músculo liso de las vías aéreas en el asma alérgica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Desarrollar el modelo de asma alérgica en cobayos.
2. Obtener las proteínas presentes en tejido traqueal de cobayos control y de cobayos del modelo de asma alérgica a través de electroforesis de una y dos dimensiones.
3. Identificar las proteínas presentes en el tejido traqueal de cobayos controles y del modelo de asma alérgica obtenidas por electroforesis de una y dos dimensiones a través de espectrometría de masas en un sistema MALDI-TOF-TOF MS/MS.
5. Determinar la presencia y localización de algunas proteínas identificadas por espectrometría de masas en el MLT, MLIn, epitelio y lámina propia de cobayos control y con modelo de asma alérgica por medio de la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tráquea y lóbulo inferior pulmonar izquierdo.
5. Realizar el estudio de interacción proteína-proteína por medio de un análisis de redes de proteínas utilizando el programa de libre acceso *STRING*

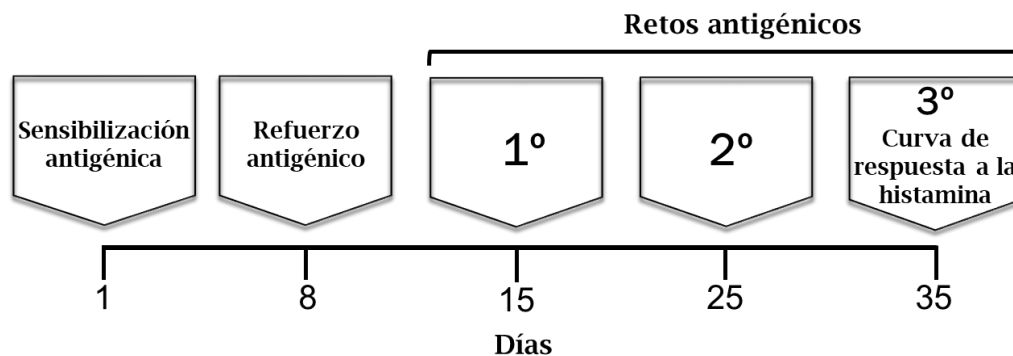
# METODOLOGÍA

## 1. Animales

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de cepas HsdPoc: DH de Harlan México con pesos entre 350g-400g, mantenidos en condiciones estables en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), con humedad convencional de 50-70%, temperatura, alimentación, ciclos de luz y oscuridad controlados 12/12, aire filtrado a 21°C +/-1 y cama esterilizada. Se alimentaron *ad libitum* con alimento para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua estéril. Los animales se dividieron en dos grupos, el primero correspondió al grupo control y el segundo al grupo del modelo de asma alérgica. Este proyecto fue aprobado por los comités Ético y Científico del INER (B37-12, DI/CCB/344/12, 29 de noviembre de 2012). Los experimentos se realizaron bajo las Normas Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-SSA1- 2002.

## 2. Modelo de asma alérgica en cobayo

El modelo de asma alérgica en cobayo constó de 35 días, dentro de los cuales, fueron expuestos a diferentes dosis de (OVA) durante los días correspondientes a la sensibilización antigénica y refuerzo antigénico, seguido de tres retos antigénicos con intervalos de 10 días entre cada reto (Fig. 11).



**Figura 11. Estructura del modelo de asma alérgica en cobayos.** Día 1. Sensibilización antigénica con OVA e hidróxido de aluminio por vía de administración subdérmica e intraperitoneal. Día 8. Refuerzo antigénico con OVA nebulizada. Día 15. Primer reto antigénico con OVA nebulizada. Día 25. Segundo reto antigénico con OVA nebulizada. Día 35. Tercer reto antigénico con OVA nebulizada y administración de dosis crecientes de histamina mediante una curva de dosis-respuesta a la histamina para la evaluación de la reactividad de las vías aéreas.

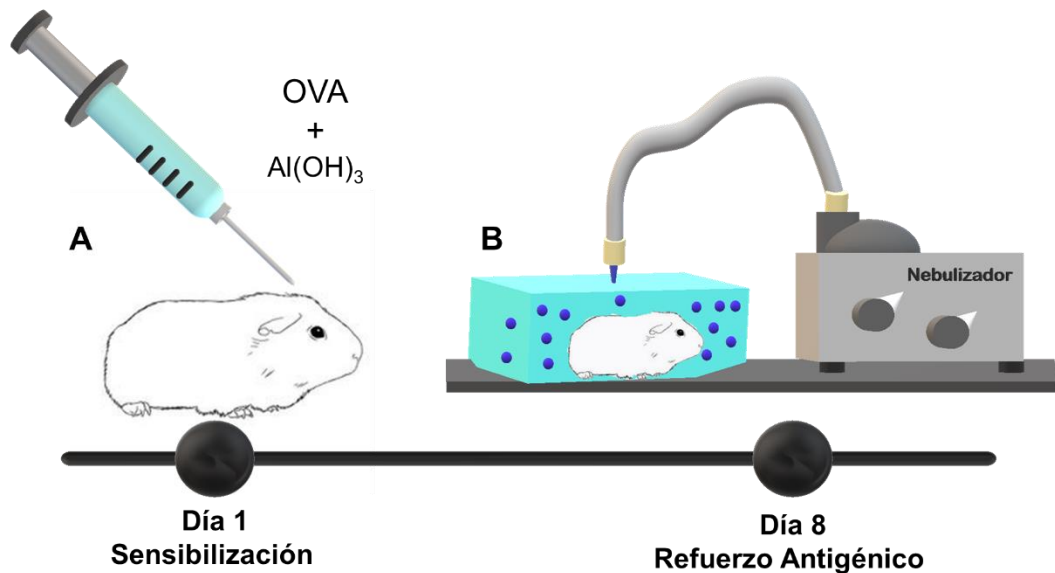
### 2.1. Sensibilización antigénica

En el día 1 del modelo de asma alérgica, se realizó la sensibilización antigénica por medio de la preparación de una solución de OVA (Sigma St Louis, EU) a una concentración de 60 mg/ml e hidróxido de aluminio como adyuvante (1 mg/ml; J.T.

Baker, NJ, EU), disueltos en 20 ml de solución salina fisiológica (SSF). Posteriormente, 6 cobayos correspondientes al modelo de asma alérgica fueron administrados con 1 ml de la solución de OVA previamente preparada, 0.5 ml vía subdérmica y 0.5 ml vía intraperitoneal, mientras que, el grupo de 6 cobayos control fueron tratados con 1ml de SSF, con la finalidad de que estuvieran sometidos bajo el mismo estrés que los cobayos del modelo de asma alérgica (Fig. 12A).

## 2.2. Refuerzo antigénico

El día 8 se reforzó la sensibilización antigénica de los cobayos del modelo de asma alérgica a través de la administración de un refuerzo antigénico, en una cámara de acrílico conectada a un nebulizador US-Bennett (flujo de 2ml/min) por el cual se administró la solución de OVA (3 mg/ml SSF) por 5 minutos (Fig. 12B). El nebulizador produce una mezcla de partículas distribuidas de la siguiente manera: el 44% es menor a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, el 38% de 4-10  $\mu\text{m}$  y el 18% mayor a 10  $\mu\text{m}$ . Los cobayos controles fueron sometidos sólo a la administración de SSF nebulizada.



**Figura 12. Modelo de asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*).** A. Sensibilización antigénica con OVA a grupo de cobayos de modelo de asma alérgica y con SSF a grupo control mediante administración subdérmica e intraperitoneal. B. Refuerzo antigénico de cobayos de modelo de asma alérgica por OVA inhalada a través de un nebulizador.

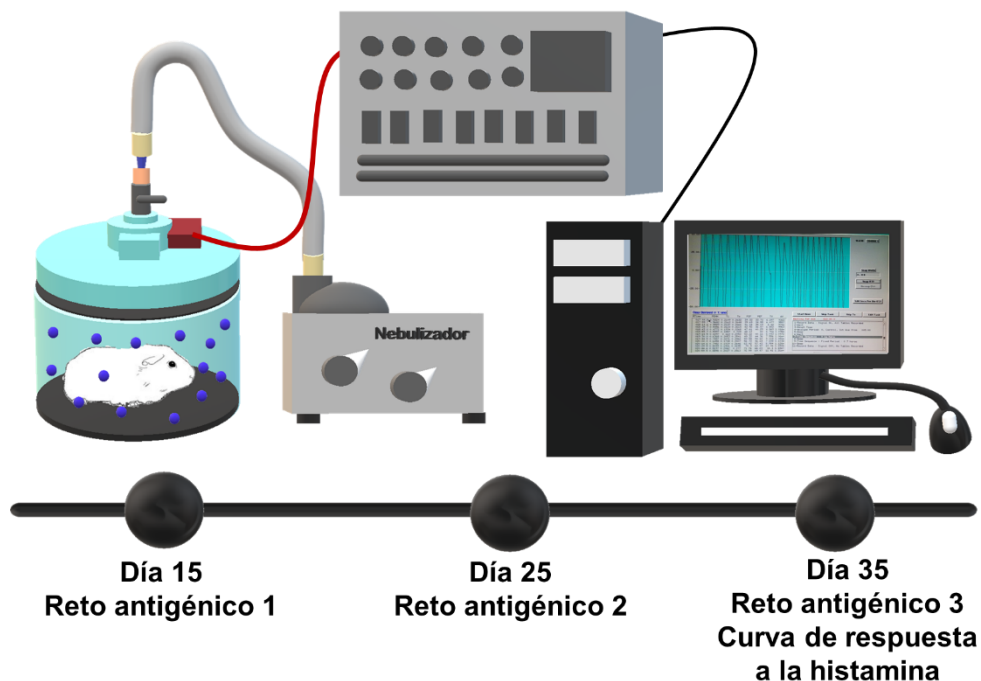
## 2.3. Retos antigénicos

El día 15 se realizó el primer reto antigénico con OVA nebulizada (1 mg/ml SSF) en una cámara pletismográfica en donde se registró el índice de broncoobstrucción (iB) basal con un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento (Buxco

Electronics Inc., Troy, NY, USA) (Fig. 13), mientras que, los cobayos controles solo recibieron SSF. La cámara fue provista de un flujo de aire continuo (10 ml/s), que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. La nebulización fue administrada durante 1 minuto, realizando un registro pletoisomográfico con 1 hora de duración después del reto con OVA para obtener la respuesta de broncoobstrucción máxima.

Posteriormente, el día 25, se realizó el segundo reto antigénico con OVA (0.5 mg/ml) para los cobayos del modelo de asma alérgica y con SSF para los cobayos controles por nebulización durante 1 min. Los registros de íB basal y de respuesta fueron analizados a través del pletoisomógrafo barométrico para animales en libre movimiento (Fig. 13).

Finalmente, el día 35, se llevó a cabo el tercer reto antigénico por medio de la nebulización de OVA (0.5 mg/ml). Los registros en el pletoisomógrafo barométrico para animales en libre movimiento fueron obtenidos después de 1 min de administración de OVA nebulizada. Además de realizar el tercer reto antigénico, en el día 35, se evaluó la reactividad de las vías aéreas a través de curvas de dosis-respuesta a la histamina para ambos grupos experimentales (véase apartado *reactividad de las VA*) (Fig. 13).



**Figura 13. Modelo de asma alérgica en cobayos y pletoisomografía barométrica para animales en libre movimiento.** Se administraron tres retos antigénicos con OVA en los días 15, 25 y 35 para generar el modelo de asma alérgica, también se les midió el íB por medio del análisis de pletoisomografía barométrica para animales en libre movimiento. Adicional, en el día 35 se realizó la evaluación de la hipersensibilidad de las vías aéreas a la histamina.

### **3. Pletismografía barométrica para animales en libre movimiento**

El sistema de pletismografía barométrica se basa en la medición directa de las variaciones de presión que se presentan dentro de una cámara inferior en donde se encuentra el animal y las compara con una presión de referencia presente en la parte superior de la cámara pletismográfica. Dichas variaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym Milpitas, CA, EU) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por el programa Buxco Byosistem XA v1.1, el cual se ajustó para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. Lo anterior, con el fin de no incluir registros ajenos al experimento, tales como los movimientos del cobayo en donde aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada periodo fueron eliminadas debido a esta causa. Cada valor de íB fue el promedio de 15 s de lecturas, y de éstas, el promedio de los últimos 5 minutos de cada periodo (Álvarez-Santos, 2017).

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

La información que se procesa da el valor del íB que es obtenido con la siguiente fórmula:

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

donde:

Te = Tiempo total espirado (s)

Tr = Tiempo total de relajación (s)

PFE = Pico de flujo espiratorio (presión positiva máxima, cmH<sub>2</sub>O)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH<sub>2</sub>O)

#### **4. Reactividad de las vías aéreas**

En día 35, se llevó a cabo la evaluación de la reactividad de las VA, mediante la comparación de las curvas de dosis-respuesta a dosis crecientes de histamina antes y después del reto antigénico con OVA. Primeramente, se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron dosis crecientes de histamina (Sigma St. Louis, EU) con diferentes concentraciones (0.01 mg/ml; 0.013, 0.018 mg/ml, 0.032 mg/ml, 0.042 mg/ml, 0.056 mg/ml, 0.074 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.13 mg/ml, 0.18 mg/ml y 0.32 mg/ml) durante 1 min, tanto para el grupo del modelo de asma alérgica, como para el grupo control. Para cada dosis se registró el íB durante 5 min continuos, obteniendo el promedio final. La respuesta a la histamina se determinó una vez que la histamina produjo una broncoobstrucción que triplicó el valor basal del íB (Dosis provocativa 200 o DP<sub>200</sub>). Después de lo anterior, se esperó a que el íB disminuyera aproximadamente el 50% de su valor basal para dar comienzo con la administración de OVA correspondiente al reto antigénico del día 35. Tres horas después del reto con OVA, se realizó la segunda curva acumulativa de histamina con el mismo protocolo que en la primera curva (Álvarez-Santos, 2017).

#### **5. Eutanasia de animales**

Veinticuatro horas después de la realización de la curva dosis-respuesta de histamina, los cobayos se sometieron a la eutanasia por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico (28 mg/Kg; PiSa, México). Cuando los cobayos cayeron en paro cardiorrespiratorio, se procedió con la disección del tejido. Primeramente, se extrajo una banda de tejido traqueal que comprendía la banda de MLT, lámina propia y el epitelio de las VA, el cual fue almacenado en solución de inhibidores de proteasas a -70°C para su subsecuente análisis. Además, un segmento traqueal medio y el lóbulo inferior pulmonar izquierdo fueron diseccionados y embebidos en una solución de formalina al 10% de 24-48 horas.

#### **6. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

El tejido traqueal, tanto de cobayos control como del modelo de asma alérgica, fueron sometidas al procedimiento de precipitación y cuantificación de las proteínas. El MLT fue homogenizado (PRO200; Pro Scientific Inc., Oxford, CT, USA) en buffer de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.7 mM a un pH de 7.4 con KCl 0.04 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM) a 4 °C y sonicado tres veces a 30% de amplitud por 30 segundos con intervalos de 1 min en hielo (Vibra-cell 75185; Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA). La suspensión se desalinizó y precipitó a -20°C en una solución que contenía acetona, 10% de ácido tricloroacético (TCA) y 20 mM de ditioneitol (DTT). Los botones celulares fueron resuspendidos en buffer de fosfatos a -4°C. Seguidamente se realizó una cuantificación de proteínas para evaluar la concentración de proteína presente en la muestra previamente precipitada, por medio del Kit de ensayo de



proteínas de Lowry DC (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Inmediatamente de la cuantificación se realizó la electroforesis.

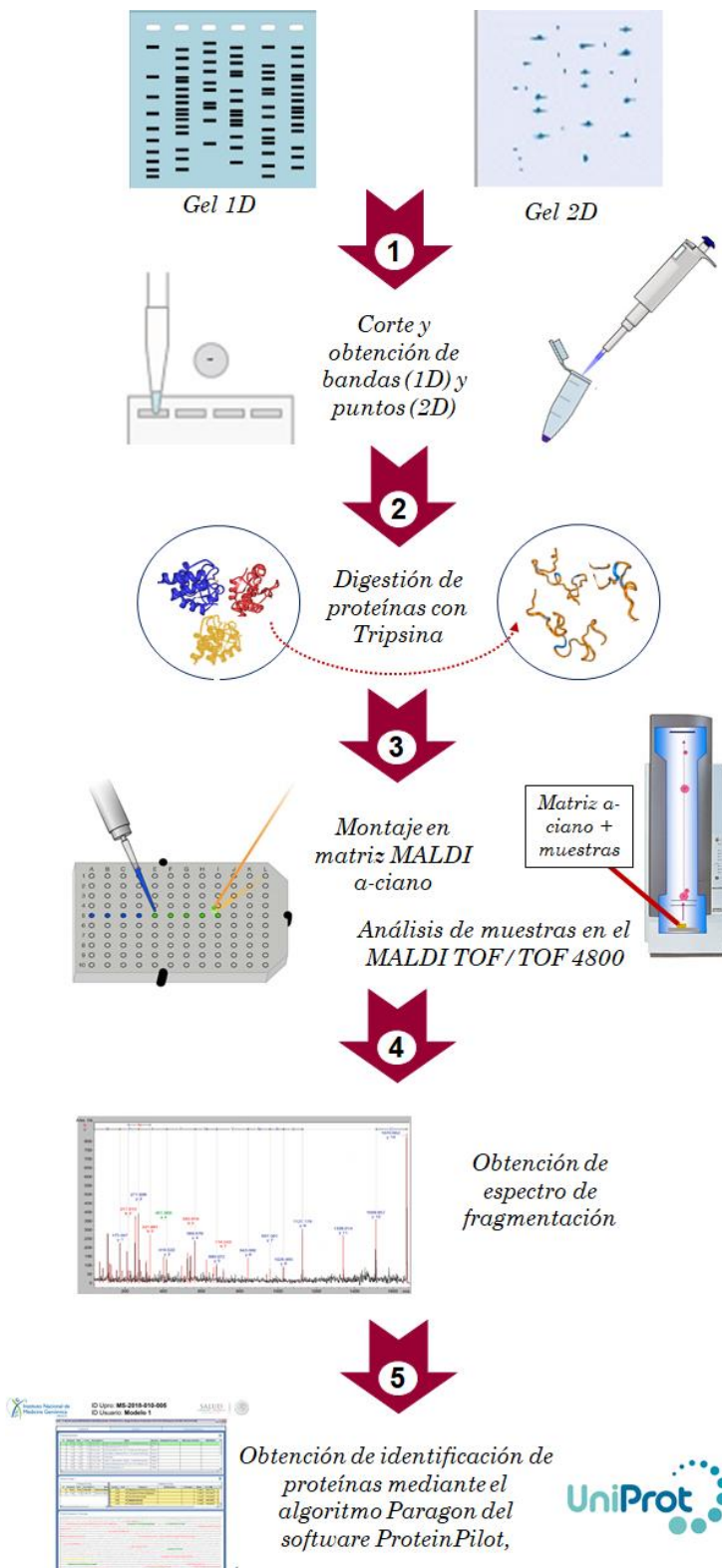
Para la electroforesis de una dimensión (1D), se utilizaron geles de 12 pozos NuPAGE™, Bis-Tris 4-12 %, 1,0–1,5 mm, corridos en condiciones reductoras con 2.5% de 2-mercaptoetanol y reactivos sugeridos por Laemmli (1970). Las proteínas fueron cargadas a diferentes concentraciones de proteína (15µg, 30µg y 50µg/carril) y separadas con un mini-sistema comercial (Mini-Protean II; Bio-Rad) a 80 V para concentración y 120 V para separación, usando un Power pack 3000 (Bi-Rad). La electroforesis de 1D incluyó el marcador de peso molecular comercial Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad).

Para la electroforesis de dos dimensiones (2D), se preparó una solución de hidratación para cada una de las muestras a cargar (Urea 7M, tiurea 2M, Chaps 4%, DTT 60 mM, azul bromofenol y anfolitos pH 3-10). La concentración a cargar de cada muestra fue de 150 µg de proteína. Todo lo anterior fue aforado a 125 µL y cargado en tiras IPG (ReadyStrip™ IPG Strips; Bio-Rad) con aceite mineral, hidratando a temperatura ambiente 25-27°C por un máximo de 16 hrs. Seguidamente, las tiras fueron corridas en un equipo de isoelectroenfoque (PROTEAN IEF Cell; Bio-Rad) con método “70CMEXTRACT”, a tres pasos: 250 mV voltaje lineal por 20 min, 4000 V voltaje lineal por 2 hrs y 4000V hasta alcanzar 10,000 V/hr en pendiente rápida, con amperaje de 50 mA por tira, usando puentes Electrode Wicks (PROTEAN IEF System; Bio-Rad). Después de lo anterior, las tiras fueron sometidas a 15 min en solución de equilibrio con DTT (1.5 M tris pH=8.8, urea 6M, glicerol 87%, SDS 2%, azul bromofenol, DTT 60 mM) y a 15 min subsecuentes en solución de equilibrio con Iodoacetamida (1.5 M tris pH=8.8, urea 6M, glicerol 87%, SDS 2%, azul bromofenol, Iodoacetamida 2.5%). Una vez concluida la corrida electroforética de 2D, se procedió a colocar la tira en geles para isoelectroenfoque NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% IPG-well para realizar la electroforesis de 1D, tal como se describió anteriormente.

## **7. Espectrometría de masas**

A partir de los geles de poliacrilamida de una y dos dimensiones, los puntos y bandas fueron cortadas manualmente por medio de micropipeteo, para después ser reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con iodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (50:50 v/v). Seguidamente, la digestión proteica fue realizada con tripsina grado masas (Promega V528A) en incubación a 37°C por 18 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se extrajeron los péptidos con ACN: H<sub>2</sub>O: ácido fórmico 50:45:5 v/v, disminuyendo posteriormente el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y desalándola utilizando una columna C18 (ZipTipC18). La muestra fue colocada por sextuplicado en una placa específica utilizando como matriz α-ciano y siendo analizada en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF 4800. Una vez obtenidos los espectros MS/MS, se realizó una

búsqueda con el algoritmo Paragon del software ProteinPilot utilizando un porcentaje de confianza del 66% (Fig. 14).



**Figura 14. Espectrometría de masas en sistema MALDI TOF/TOF MS/MS.** 1. Los puntos y bandas presentes en los gels de poliacrilamida fueron cortados manualmente a través de micropipeteo. 2. Las proteínas presentes en las muestras fueron digeridas con tripsina grado masas. 3. Las muestras fueron colocadas en una placa de matriz  $\alpha$ -ciano para controlar el medio sólido antes del análisis de vuelo. 4. Las muestras fueron sometidas a los tiempos de vuelo y detección en el espectrofotómetro de MALDI TOF/TOF MS/MS 4800. 5. La detección de los péptidos en el espectrómetro de masas mostró los histogramas de cada fragmento obtenido a partir de las muestras analizadas. 6. Los datos de los espectros peptídicos fueron sometidos a un algoritmo *Paragon* del software *ProteinPilot* en la base de datos UniProt, utilizando un porcentaje de confianza del 66%.

## **8. Construcción del proteoma-interactoma del músculo liso traqueal**

Las proteínas identificadas por espectrometría de masas y algunas analizadas previamente en el grupo de trabajo, fueron acomodadas en lista dentro del programa de libre acceso *STRING-functional protein association networks* obteniendo un interactoma previo, sólo de la relación de las proteínas. El valor de enriquecimiento correspondió al porcentaje de probabilidad funcional y biológica de interacción entre las proteínas analizadas. Basándonos en los resultados antes mencionados, se construyó un nuevo formato del interactoma tomando en cuenta la expresión de las proteínas analizadas por IHC presentando proteínas que incrementan su expresión (color rojo), que no presentan cambios de expresión (color amarillo) y aquellas que disminuyen su expresión (color azul) en el asma alérgica.

## **9. Inmunohistoquímica en parafina**

El segmento traqueal obtenido por medio de un corte transversal y el segmento del lóbulo inferior pulmonar izquierdo de los cobayos control y modelo de asma alérgica embebidos en solución amortiguadora de formalina al 10% fueron deshidratados en un tren de deshidratación que constó de la siguiente manera: agua destilada (dH<sub>2</sub>O) por 10 min, alcohol 96% por 10 min, alcohol absoluto por 10 min y xilol por 10 min. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en parafina. Seguidamente, el bloque de parafina que incluía a los tejidos fue cortado en un micrótomos a grosores de 3-4 µm, para después ser colocado en una laminilla silanizada. En el día 1 de la inmunohistoquímica, las laminillas fueron desparafinadas en una estufa de cultivo a 30°C durante 30 min y rehidratadas por medio de una solución de Xilol por un tiempo de 10 min, alcohol absoluto por 5 min, alcohol 96% por 5 min hasta y dH<sub>2</sub>O por 10 min. La recuperación antigénica se realizó con buffer un de citrato de sodio 10 mM a pH=6 por 10 min en un horno de microondas. Los sitios no específicos fueron bloqueados con suero de caballo al 2% del Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector laboratorios, USA), Las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos monoclonales para las proteínas a analizar que se enlistan en la tabla 1. Las laminillas correspondientes al blanco, fueron tratadas de la misma manera que las experimentales, excepto con la incubación con el anticuerpo primario. En el día 2 de la inmunohistoquímica, las muestras y el blanco fueron incubadas con peróxido de hidrógeno grado reactivo al 3% (concentración 30%, HYCEY, México) con el fin de bloquear a la peroxidasa endógena. Para detectar la unión específica de los anticuerpos primarios se usó el anticuerpo secundario del Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector laboratorios, USA), incubando las muestras y el blanco por 1:40 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras y el blanco fueron lavadas e incubadas con un complejo de peroxidasa/estreptavidina del Kit Universal R.T.U Vectastain (Vector laboratorios, USA). Finalmente se usó el Kit DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, (3,3'-diaminobenzidine, Vector laboratorios, USA) como cromógeno revelador. Las muestras y el blanco

fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer (Vector laboratorios, USA) por 10 minutos y sometidas a viraje con una solución de ácido acético glacial al 2% (Sigma St. Louis, EU) e incubadas con una solución de hidróxido de amonio al 0.03% (Sigma St. Louis, EU) para la coloración azul. Las laminillas fueron lavadas dos veces con TBS-Tween 1% durante el término de cada proceso.

**Cuadro 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para IHC.**

<b>Proteína</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
<b>Cadena ligera de miosina (MYL9)</b>	ANTIBODYMYL9/MYL12A/B (E-A), SANTA CRUA SC-28329	1:100
<b>Cadena pesada de miosina (MYH11)</b>	ANTIBODY MYH11 (G-4), SANTA CRUZ, SC-6956	1:50
<b><math>\beta</math>-actina (ACTB)</b>	ANTIBODY B-ACTIN, GeneTex, GT5512	1:250
<b><math>\gamma</math>-actina (ACTG1)</b>	ANTIBODY V-ACTIN (1-17), SANTA CRUZ SC-65638	1:100
<b>Filamina A (FLNA)</b>	FILAMIN 1 ANTICUERPO (3F180), SANTA CRUZ SC-71118	1:250
<b><math>\alpha</math>-actina (ACTA2)</b>	MONOCLONAL ANTI-ACTIN, A-SMOOTH MUSCLE (A-2547), SIGMA INMUNOCHEMICALS	1:500
<b>PPP1R3A (RG1)</b>	PPP1R3 ANTIBODY (C-8), SANTA CRUZ sc-398425	1:50
<b>Transgelina (TLNG)</b>	TRANSGELIN ANTICUERPO (6G6), SANTA CRUZ SC-53932	1:100

### **10. Análisis de expresión en el programa ImageJ-Fiji**

Para determinar la expresión de la marca positiva de las proteínas analizadas por inmunohistoquímica, se tomaron fotografías en un microscopio óptico de las diferentes estructuras en donde se presentó la expresión, a un aumento de 40x. Posteriormente, las imágenes obtenidas fueron analizadas en el programa ImageJ-Fiji mediante la evaluación total de píxeles que presentaban marca positiva para cada una de las proteínas. Primeramente, se tomaron 5 cuadrantes al azar en las imágenes correspondientes a las estructuras de MLIn, MLT, epitelio y lámina propia de los cobayos pertenecientes al grupo modelo de asma alérgica y control. Seguidamente, cada uno de los cuadrantes fue sometido a un análisis de *Color Dencovolution*, en donde los píxeles se separan por colores dependiendo de la técnica que se utilizó para revelar la marca del anticuerpo. Para el caso del presente análisis, se utilizó la separación de DAB-H correspondiente al color de marca obtenido por la técnica de diaminobencidina. Una vez obtenida la segunda imagen propia de la coloración de diaminobencidina, fue revertida a píxeles blanco/negro,

en donde el blanco correspondió a la cantidad de pixeles que presentaban marca positiva, mientras que el negro fue identificado como el fondo de la imagen, es decir, la zona en donde no se presentaba la marca del anticuerpo. Finalmente, se determinó el histograma de pixeles que permitió analizar dos picos correspondientes al blanco (marca positiva) y al negro (fondo), comparando finalmente el número de pixeles totales que correspondían a la intensidad de marca.

### **11. Materiales**

Ovoalbúmina (chicken egg albumin) grado II, hidróxido de aluminio, histamina, pentobarbital sódico, inhibidores de proteasas, ácido tricloroacético (TCA), acetona, DTT, 2-mercaptoetanol, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), Kit de ensayo de proteínas DC-Lowry, marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue, urea, tiourea, CHAPS, azul bromofenol, anfolitos pH=3-10, tiras IPG ReadyStrip™ IPG Strips, Tris, SDS, glicerol, Iodoacetamida,  $NH_4HCO_3$ , matriz  $\alpha$ -ciano, tripsina grado masas, xilol, alcohol absoluto, alcohol 96%, Kit Universal R.T.U Vectastain, peróxido de hidrógeno grado reactivo 30%, Kit DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, hematoxilina de Meyer, ácido acético glacial 2%, hidróxido de amonio 0.03%, TBS, tween 20, NaCl, anticuerpo anti-MYL9/MYL12 A/B, anticuerpo anti-MYH11, anticuerpo anti- $\gamma$  actina, anticuerpo anti- $\beta$  actina, anticuerpo anti-filamina 1, anticuerpo anti- $\alpha$  actina, anticuerpo anti-PPP1R3, anticuerpo anti-transgelina.

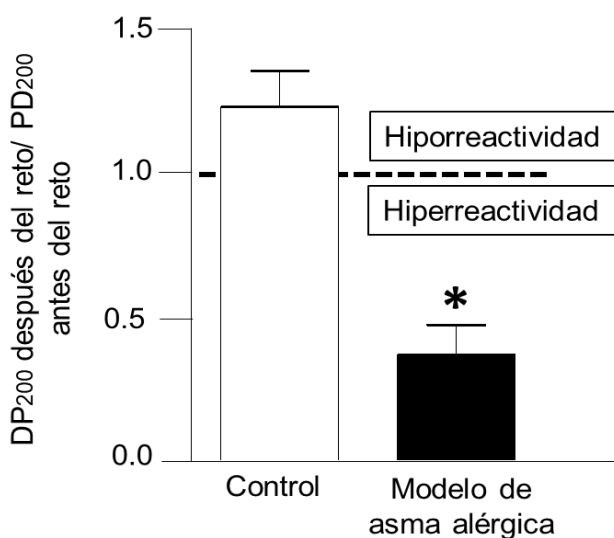
### **12. Análisis estadístico**

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

## RESULTADOS

### 1. Reactividad de las vías aéreas en cobayos del modelo de asma alérgica

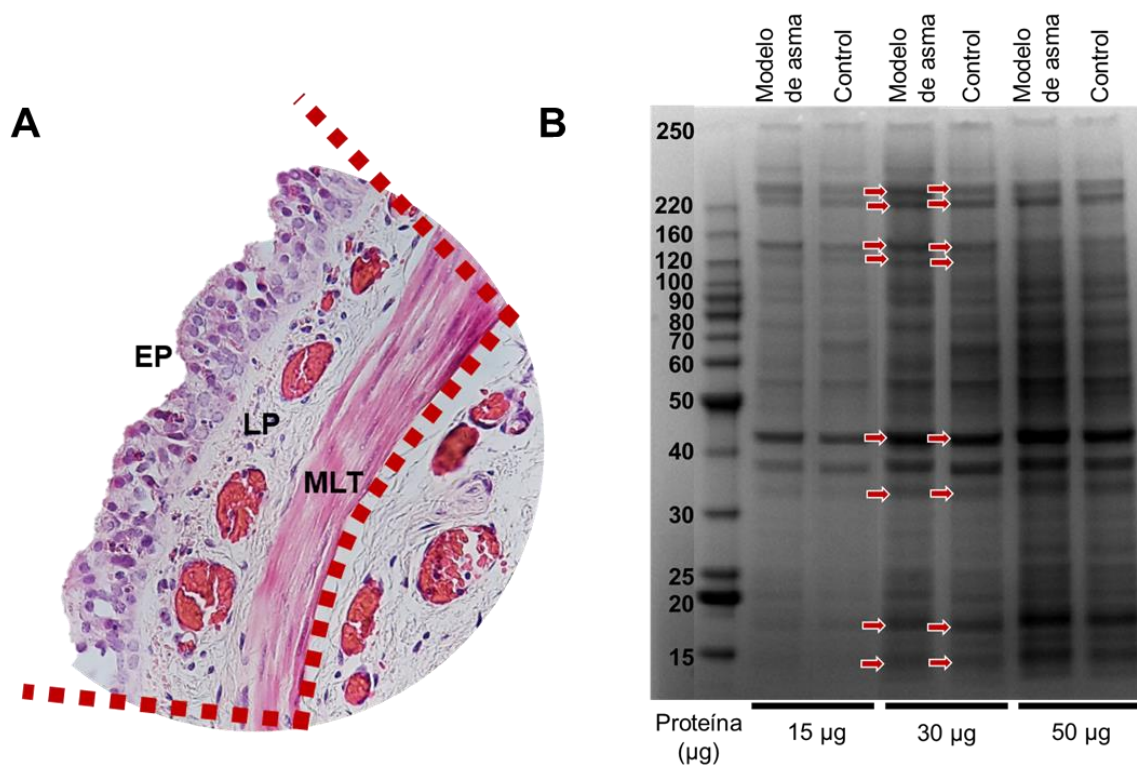
La respuesta fisiológica del asma relacionada con la obstrucción de las vías aéreas fue observada en los cobayos del modelo de asma alérgica expuestos al reto antigénico con OVA, mientras que en los cobayos controles retados con SSF no se presentó respuesta. Para evaluar la reactividad de las vías aéreas, los cobayos del modelo de asma alérgica y controles fueron sometidos a la exposición de curvas dosis-respuesta de histamina (0.01 mg/ml-0.32 mg/ml) antes y después de un reto antigénico con OVA. El promedio de la diferencia entre los valores de la concentración de histamina a la cual los cobayos triplican el valor basal del índice de broncoobstrucción, conocida como dosis provocativa 200 (DP<sub>200</sub>), antes y después del reto antigénico con OVA, permitió observar una disminución significativa del DP<sub>200</sub> en los cobayos del modelo de asma alérgica en comparación con el grupo control (Fig. 15).



**Figura 15. Hiperreactividad de las vías aéreas en cobayos del modelo de asma alérgica.** Diferencia del valor DP<sub>200</sub> antes de la exposición antigénica con OVA, entre el valor de la DP<sub>200</sub> después de la exposición antigénica en respuesta a la curva dosis-respuesta de histamina. La barra en color negro muestra una disminución significativa del valor DP<sub>200</sub> comparado con el valor obtenido en el grupo control (barra blanca). Los valores corresponden al análisis de la media  $\pm$  el error estándar. La línea punteada identifica el valor de hiperreactividad (por debajo de 1) y de hiporreactividad (por arriba de 1) observados en ambos grupos, n = 6 cobayos por grupo. \*  $p < 0,05$ , prueba *t* de *Studen* *t* no pareada.

## 2. Proteínas presentes en geles de electroforesis de una y dos dimensiones de cobayos del modelo de asma alérgica

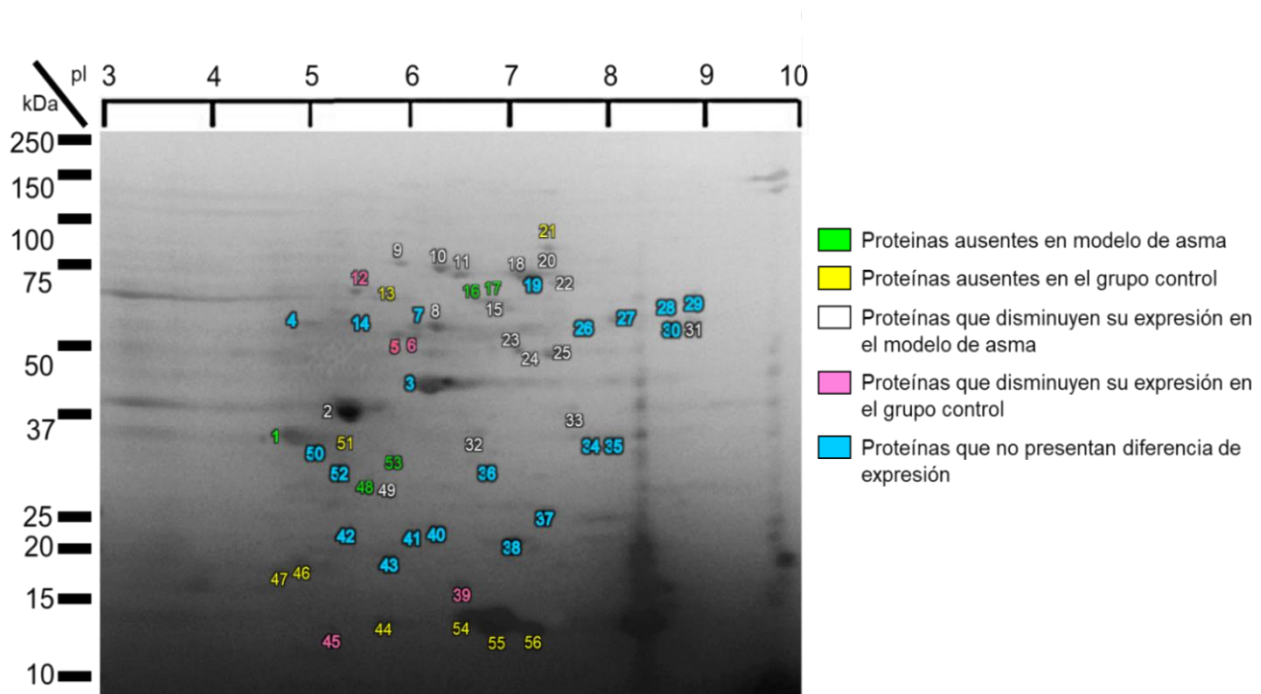
A partir de la disección de tejido traqueal correspondiente a tiras de MLT, epitelio de las VA y lámina propia (LP) (Fig. 16A), las proteínas fueron extraídas y analizadas a través de electroforesis de 1D, obteniendo bandas de proteínas con pesos moleculares de 17-250 kDa, tanto de cobayos del modelo de asma alérgica como cobayos del grupo control. Con la finalidad de analizar la concentración óptima de las proteínas presentes en la muestra, los carriles 1 y 2 fueron cargados con 15µg de proteína, los carriles 3 y 4 con 30µg de proteína, mientras que los carriles 5 y 6 correspondieron a los cargados con 50µg de proteína para cada grupo experimental. Después de analizar la intensidad de las bandas obtenidas, se seleccionaron aquellas bandas que presentaron una aparente diferencia de expresión entre los grupos experimentales. Dichas bandas fueron seleccionadas e identificadas con flechas en color rojo para los carriles de la concentración de proteína óptima de 30µg (Fig.16B).



**Figura 16. Segmentos traqueales y bandas identificadas por electroforesis de una dimensión (1D).** **A.** Segmento traqueal del tejido disectado con secciones delimitadas por líneas punteadas en color rojo, correspondientes a epitelio (EP), lámina propia (LP) y MLT. **B.** Gel de electroforesis de 1D. Carril 1 y 2 (15µg), carril 3 y 4 (30µg), carril 5 y 6 (50µg). Bandas marcadas con flechas rojas, fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas en el sistema MALDI-TOF-TOF MS/MS. Gel de poliacrilamida SDS/PAGE, n=6 cobayos por grupo, imagen tomada en ChemiDoc Imaging Systems, Bio-Rad.



De igual forma, las proteínas fueron analizadas por electroforesis de 2D, obteniendo los mapas proteómicos para ambos grupos experimentales. El empalme de ambos mapas (Fig. 17) permitió identificar un total de cincuenta y seis puntos. Como se observa en la Fig. 17, los puntos pertenecientes a los números 1, 16, 17, 48 y 53 (señalados en color verde) estuvieron ausentes en el grupo del modelo de asma alérgica, pero presentes en el grupo control, mientras que, los puntos ausentes en el grupo control, pero presentes en el grupo del modelo de asma alérgica, correspondientes a los números 13, 21, 44, 46, 47, 51, 54, 55 y 56 fueron identificados en color amarillo (Figura 17). De los cuarenta y dos puntos restantes, dieciséis de ellos disminuyeron aparentemente su expresión en el grupo del modelo de asma alérgica, correspondientes a los puntos 2, 8, 9, 10, 11, 15, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 31, 32, 33 y 49 señalados con números en color blanco (Fig. 17). Cinco puntos correspondientes a los números 5, 6, 12, 39 y 45 en color rosa, disminuyeron su expresión en el grupo control, mientras que veintiún puntos presentes en ambos grupos correspondientes a los números 3, 4, 7, 14, 19, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 50 y 52 no presentaron cambios de expresión (señalados con números en color azul) (Fig. 17).



**Figura 17. Análisis de expresión de proteínas presentes en cobayos del modelo de asma alérgica por electroforesis 2D.** Superposición de los mapas proteómicos de cobayos del modelo de asma alérgica y control. 56 puntos totales fueron expresados en ambos geles. *Tiras de gel correspondientes a valores de pH=3-10. Geles SDS/PAGE 2D, n=6 cobayos por grupo, imagen tomada en ChemiDoc Imaging Systems, Bio-Rad.*



### 3. Identificación de proteínas en cobayos del modelo de asma alérgica por espectrometría de masas a partir de geles de electroforesis 1D y 2D

Después del análisis de los geles de electroforesis, se identificaron aquellas bandas que aparentemente presentaban una diferencia de expresión en la electroforesis de 1D y aquellos puntos que eran constantes y representativos en los geles de electroforesis de 2D de cobayos del grupo control y del modelo de asma alérgica que presentaban una diferencia de intensidad. Dichas bandas y puntos fueron cortados y analizados por espectrometría de masas (EM) en un sistema de MALDI-TOF-TOF MS/MS. Lo anterior fue realizado con el fin de identificar el mayor número posible de proteínas para ambos grupos. Se identificaron un total de 27 proteínas después del análisis de espectrometría de masas. Estas proteínas identificadas se presentan en el cuadro 2.

#### Cuadro 2. Proteínas identificadas en tejido traqueal de cobayos del modelo de asma alérgica.

\*Valores separados por / corresponden al peso molecular de fragmentos peptídicos identificados por EM.

Proteína	Peso Molecular (kDa)
Actina $\alpha$ de músculo liso (ACTA2)	41.878
Actina $\beta$ citoplasmática (ACTB)	41.736
Actina $\gamma$ citoplasmática de músculo liso (ACTG1)	41.746
Anexina A5 (ANXA5)	35.877
Cadenas pesadas de miosina (MYH11)	227.53
Calmodulina like (CLML)	16.749
Colagena $\alpha$ -1 (COLA1)	138.24
Desmina (DES)	53.681
E3 ubiquitin-proteína ligasa (NHLRC1)	57.531
Filamina A (FLNA)	280
Fosfolipasa secretora A2 Grupo IID (PLA1G4A)	17.617/8.96
Malato dehidrogenasa, citoplasmática (MDH1)	36.287
Miosina 9 (MYH9)	226.593
Paraplegina (SPG7)	88.021/8.82
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA)	17.744
Polipeptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 18 (GALNT18)	69.418
Polipéptido regulador de la cadena ligera de miosina 9 (MYL9)	19.696/20
Precursor de proteína FAM3A (FAM3A)	25.316/8.68
Proteína adaptadora SH3 (SPIN90)	78.960/5.94
Proteína de anclaje a cinasa 3 (AKAP3)	93.285/6.12
Proteína fosfatasa tipo-1, subunidad dirigida al glucógeno (RG1)	37/5
Proteína LIM de unión a actina 2 (ABLIM2)	64.634/8.49
Subunidad catalítica de proteína cinasa dependiente de DNA (DNPK1)	485/7.69
Transgelina (TAGLN)	22.428
Transgelina SM22 $\alpha$ (TAGLN22)	22.61
Tropomiosina alpha-1 (TPM1)	29/4.74
Tropomiosina beta (TPM2)	32.851/4.66

#### **4. Expresión de proteínas presentes en las vías aéreas de cobayos del modelo de asma alérgica**

Algunas de las proteínas identificadas por EM fueron posteriormente seleccionadas y analizadas por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHC) en tejido traqueal e intrapulmonar a través de la identificación con anticuerpos específicos monoclonales para las proteínas MYH11, MYL9, ACTG1, ACTA2, ACTB, TAGLN, FLNA y RG1. Lo anterior también permitió analizar su localización en las estructuras de las VA y su expresión relativa a través de un análisis de intensidad de marca positiva obtenido en el programa de libre acceso ImageJ-Fiji.

##### **4.1. Expresión y localización de las cadenas de miosina**

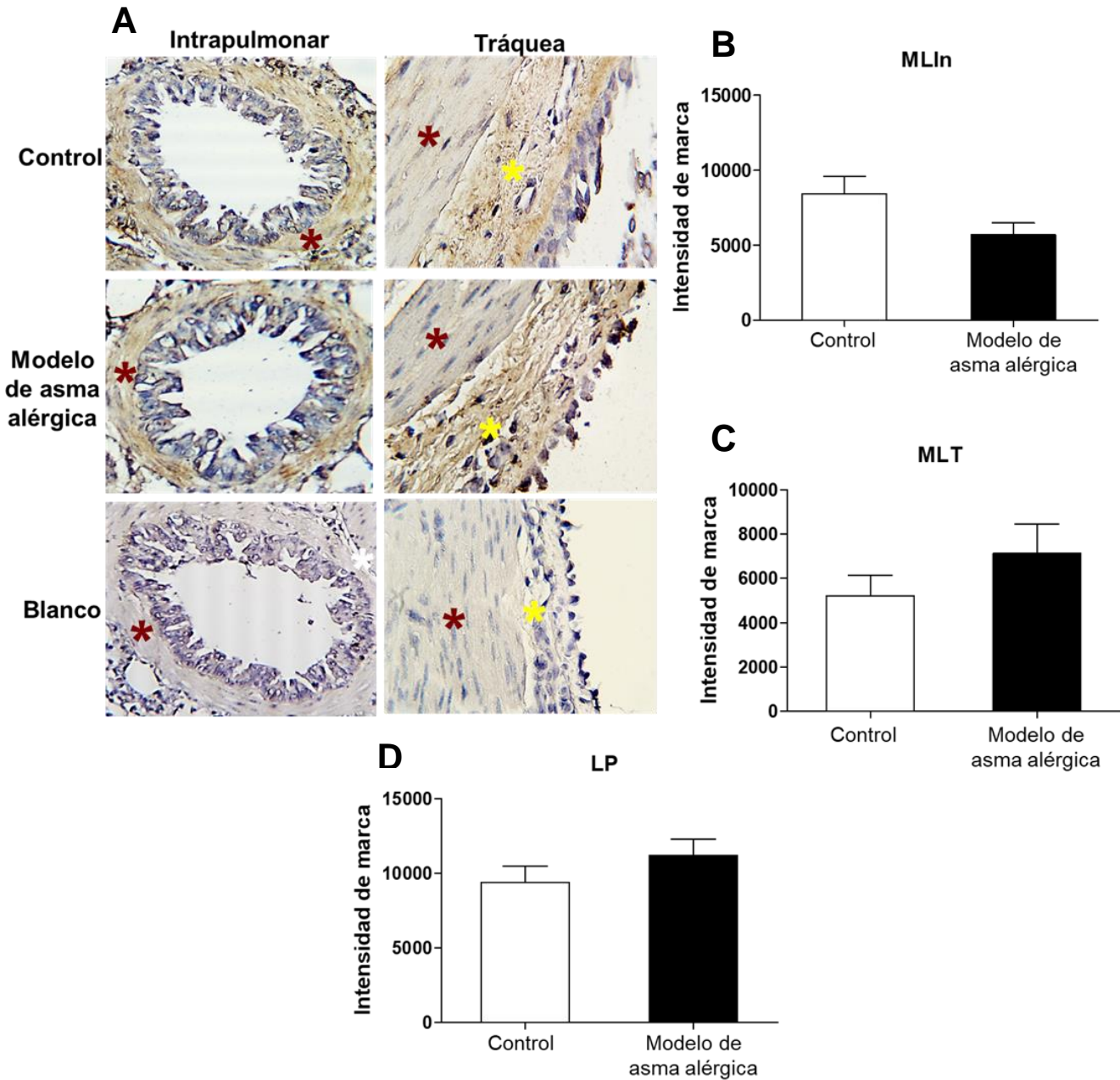
###### **4.1.1. Cadenas pesadas de miosina MYH11**

Como se observa en la Fig. 18, el análisis de IHC permitió identificar la localización de la marca positiva de MYH11 en las estructuras de MLIn, MLT y la LP de los cobayos de ambos grupos experimentales. Sin embargo, el análisis de expresión relativa de la tinción para MYH11 por análisis de píxeles obtenido en el programa ImageJ-Fiji no mostró diferencias significativas (Fig. 18B, C, D).

###### **4.1.2. Cadenas ligeras de miosina MYL9**

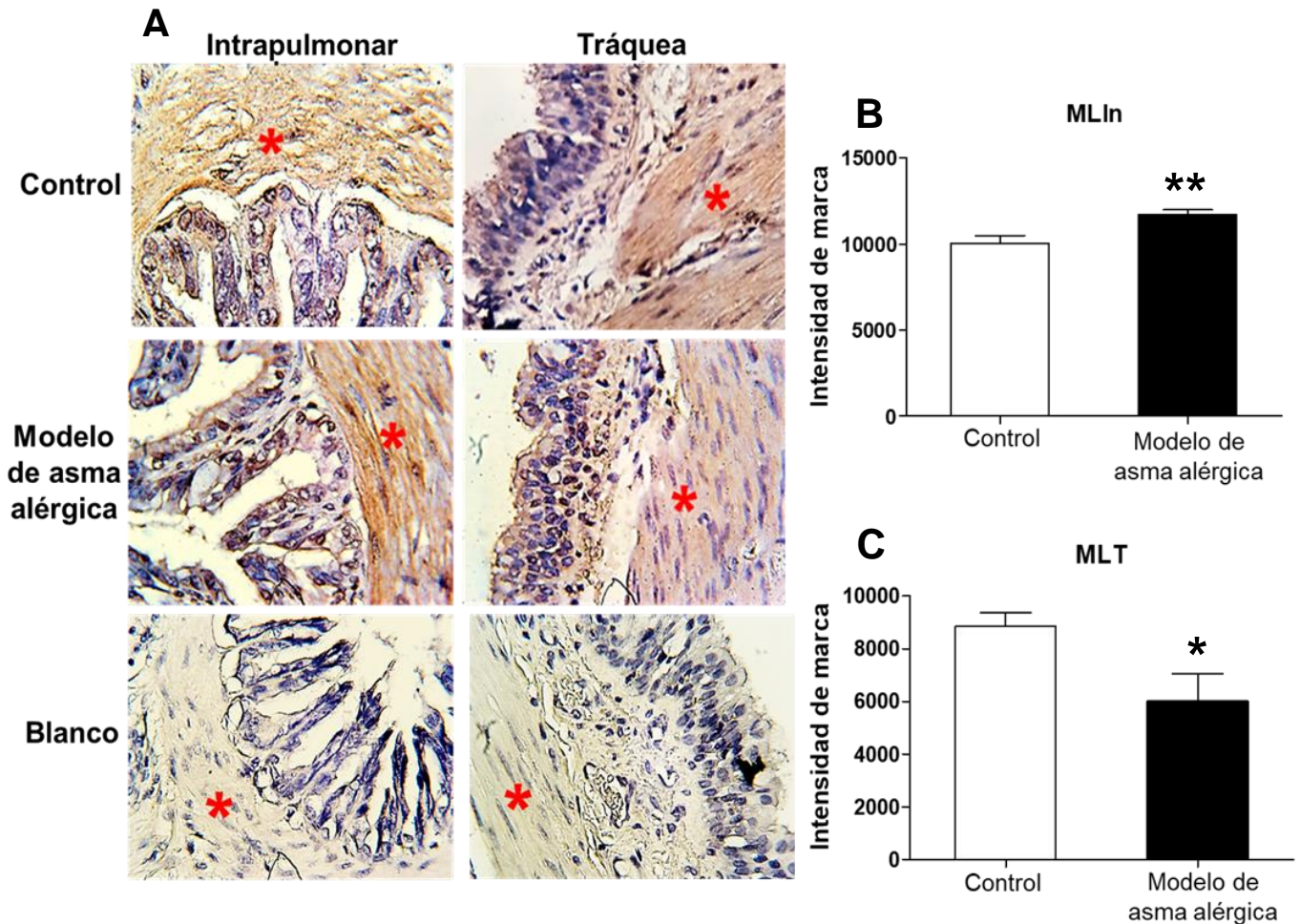
El análisis de IHC permitió identificar la localización de la tinción de la proteína MYL9 en el MLIn y MLT (Fig. 19A), en donde se presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales de cobayos del modelo de asma alérgica y del grupo control. Por un lado, hubo un incremento significativo de la intensidad de tinción para MYL9 en el MLIn ( $p < 0.01$ ) comparado con el grupo control (Fig. 19B), mientras que, en el MLT, se identificó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de MYL9 en los cobayos del modelo de asma alérgica en comparación con el grupo control (Fig. 19C).

# MYH11



**Figura 18. Expresión de tinción relativa y localización de MYH11 en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción por IHC para la proteína MYH11 en el MLIn, MLT (asterisco rojo) y LP (asterisco amarillo) en ambos grupos. B, C, D) No se observan cambios significativos de la intensidad de tinción en MLIn, MLT y LP respectivamente, para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). *Aumento 40X, t' Student no pareada, p<0.05, n=5.*

# MYL9



**Figura 19. Expresión de tinción relativa y localización de MYL9 en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína MYL9 en el MLIn y MLT (asterisco rojo) en ambos grupos. B) Incremento significativo de la expresión de tinción positiva para MYL9 en el MLIn ( $p < 0.01$ ). C) Disminución significativa de la expresión de tinción positiva en MLT ( $p < 0.05$ ). Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, *t*'Student no pareada,  $n=5$ .

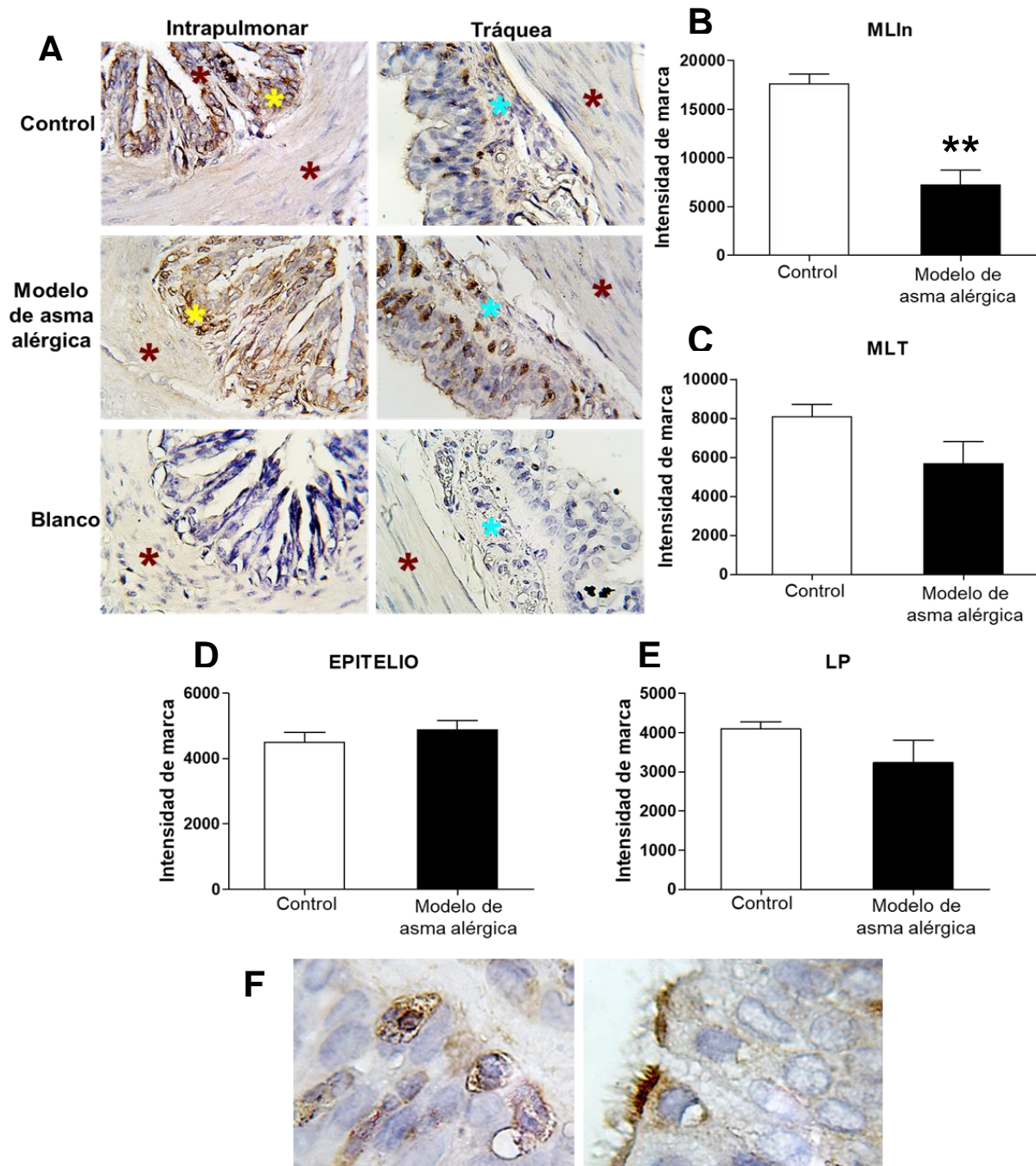
## 4.2. Expresión de isoformas de actina

### 4.2.1. Actina gamma citoplasmática ACTG1

El análisis de localización de la tinción positiva para la proteína ACTG1 permitió identificarla en los tejidos de MLT, MLIn, epitelio y LP de cobayos del modelo de asma alérgica y cobayos control (Fig. 20A). Además, el análisis de expresión de tinción positiva para ACTG1 mostró una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) para la en el MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control (Fig. 20B). Mientras que la intensidad de tinción para ACTG1 no mostró diferencias entre los grupos en las estructuras del MLT, epitelio de las VA y LP de ningún grupo



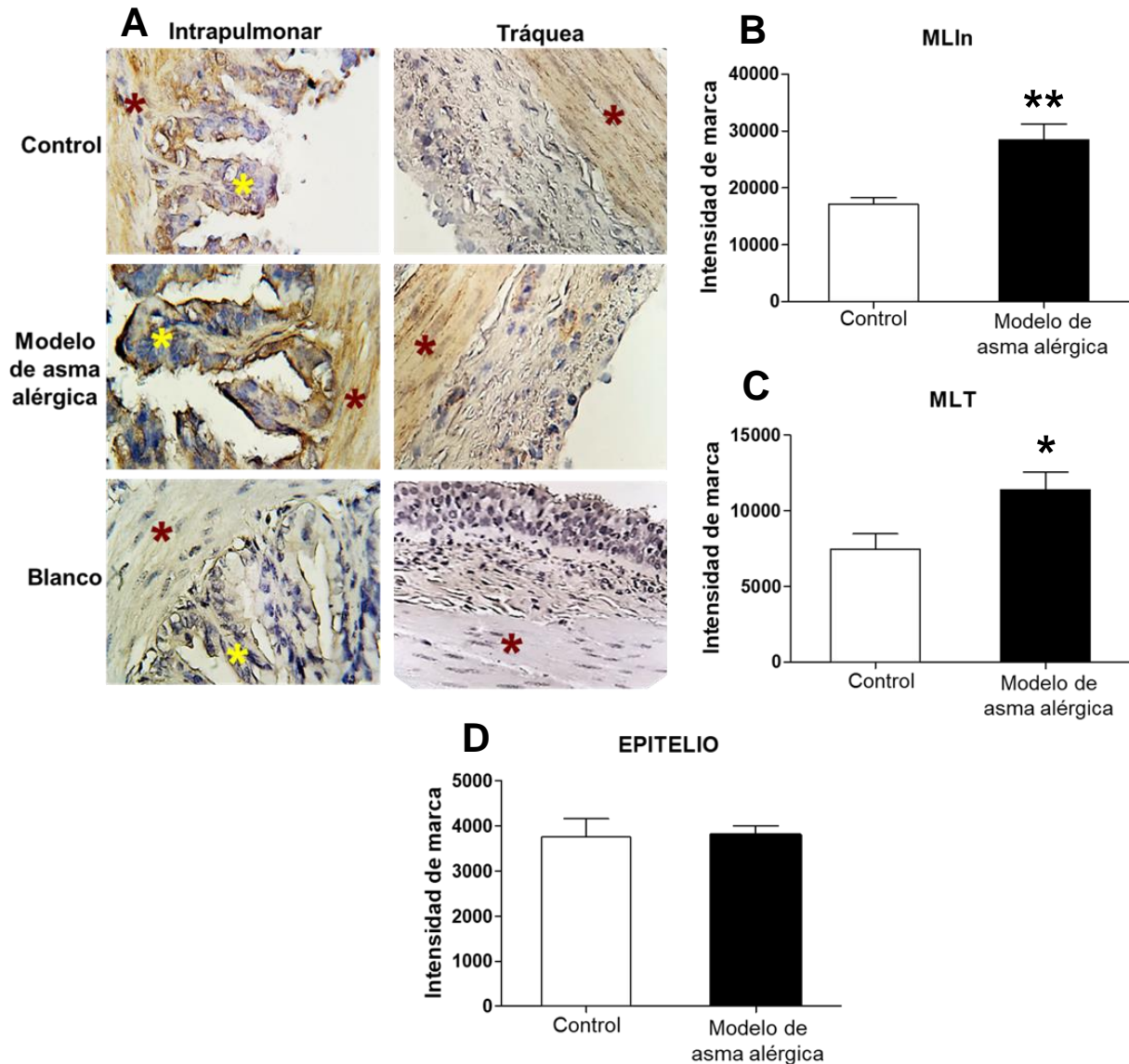
experimental (Fig. 20C, D, E). Finalmente, ACTG1 presentó tinción positiva en células polimorfonucleares y ciliadas del epitelio traqueal para ambos grupos (Fig. 20F).



**Figura 20. Expresión de tinción relativa y localización de ACTG1 en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína ACTG1 en MLIn y MLT (asterisco rojo), epitelio (asterisco amarillo) y LP (asterisco azul) en ambos grupos. B) Disminución significativa de la tinción positiva en el MLIn ( $p < 0.01$ ). C, D, E) Tinción positiva sin diferencia significativas en MLT, LP y epitelio. F) Identificación de ACTG1 en células polimorfonucleares y células ciliadas del epitelio traqueal. Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, *t*'Student no pareada,  $n=5$ .

#### 4.2.2. Actina beta citoplasmática ACTB

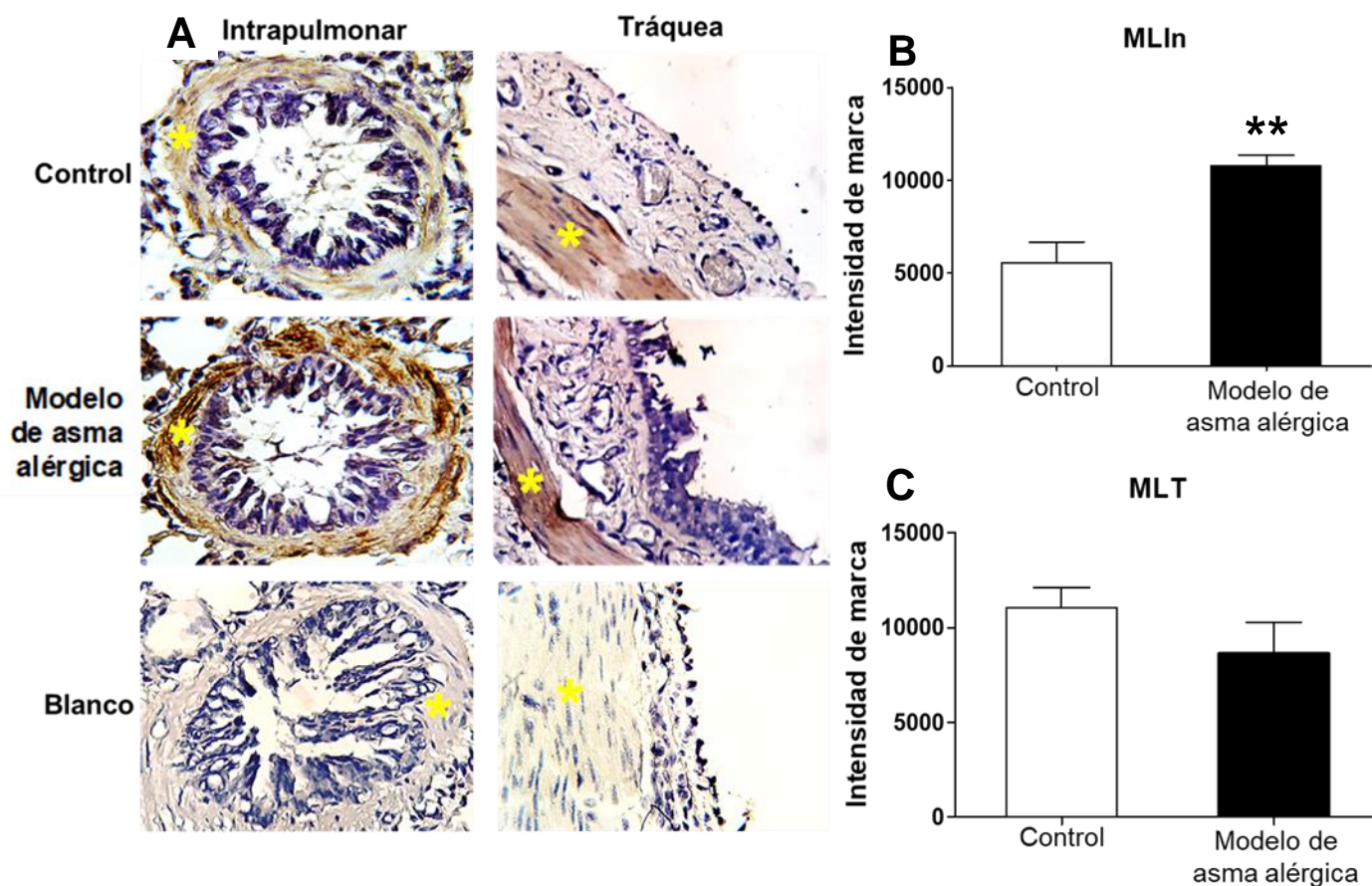
La proteína ACTB también fue evaluada por medio de IHC. Las micrografías pudieron localizar la tinción positiva para ACTB en el MLT, MLIn y epitelio intrapulmonar de cobayos del modelo de asma alérgica y control (Fig. 21A). El análisis de expresión relativa de la tinción de ACTB identificó un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en el MLIn (Fig. 21B) y MLT ( $p < 0.05$ ) (Fig. 21C) de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control. Mientras que el epitelio no mostró diferencias significativas (Fig. 21D).



**Figura 21. Expresión de tinción relativa y localización de ACTB en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína ACTB en MLIn y MLT (asterisco rojo) y epitelio intrapulmonar (asterisco verde) en ambos grupos. B) Incremento significativo de la expresión de tinción positiva de ACTB en el MLIn ( $p < 0.01$ ). C) Incremento significativo de la tinción positiva de ACTB en el MLT ( $p < 0.05$ ). D) No se presentan diferencias significativas en el epitelio de las VA. Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, *t*'Student no pareada,  $n=5$ .

#### 4.2.3. Actina alfa de músculo liso ACTA2

El análisis de IHC de la proteína ACTA2 permitió localizar la tinción positiva en el MLT y MLIn, tanto del grupo del modelo de asma alérgica como del grupo control (Fig. 22A). El análisis de expresión relativa para la tinción de ACTA2 en el programa ImajeJ-Fiji mostró un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en el MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control (Fig. 22B). Mientras que en el MLT no se observaron diferencias significativas (Fig. 22C).



**Figura 22. Expresión de tinción relativa y localización de ACTA2 en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína ACTA2 en MLIn y MLT (asterisco amarillo) en ambos grupos. B) Incremento significativo de la tinción positiva en el MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica ( $p < 0.01$ ). C) No se presentan diferencias significativas para la marca positiva en MLT. Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Cromógeno: DAB, aumento 40X,  $t$ 'Student no pareada,  $n=5$ .

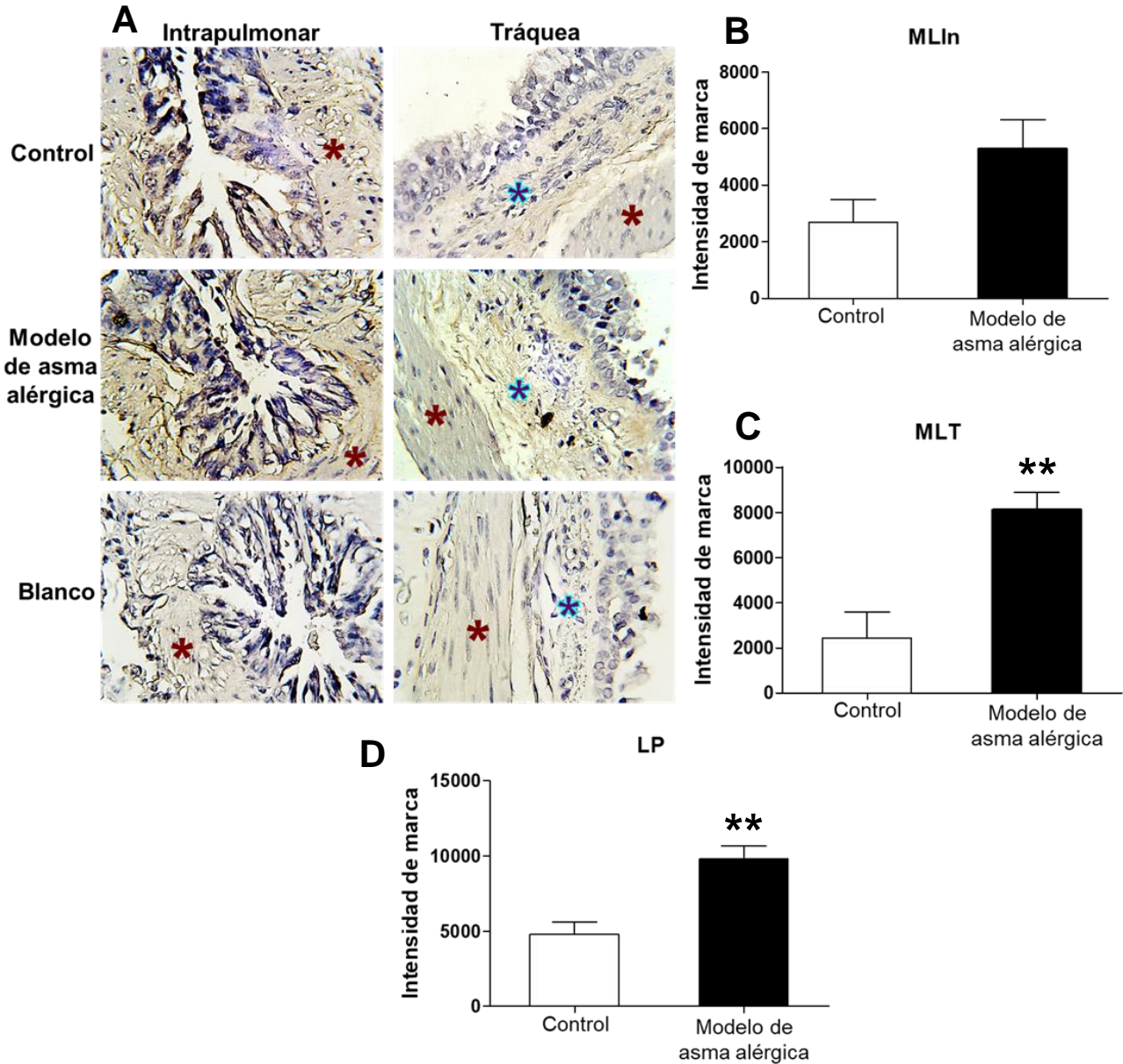
#### 4.3. Proteínas asociadas a los filamentos de actina y miosina

Por medio de la EM se identificaron diversas proteínas encargadas de la activación, polimerización, estabilización y reticulación de los filamentos de actina (Gallant et al., 2011). Por lo anterior, se seleccionaron algunas de las proteínas que interaccionan directamente con los filamentos de actina durante la contracción para ser analizadas por IHC.



#### 4.3.1. Filamina A (FLNA)

La localización de la tinción para la proteína filamina A (FLNA) mediante IHC fue identificada en el MLIn, MLT y LP de cobayos del modelo de asma alérgica y grupo control (Fig. 23A). Sin embargo, solo se observó un incremento significativo para la tinción positiva de FLNA en el MLT (Fig. 23C) y en la LP (Fig. 23D) ( $p < 0.01$ ) de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control.

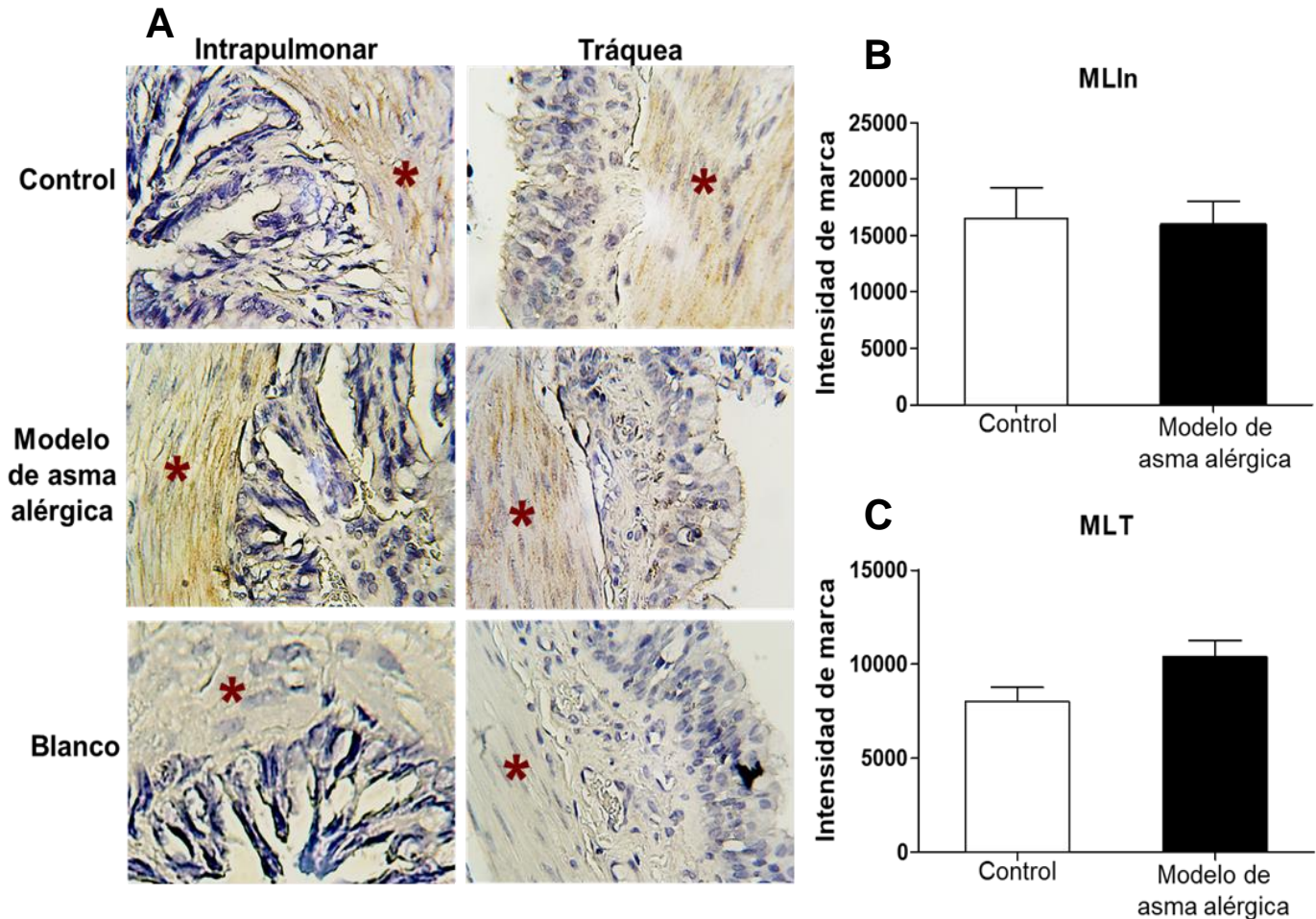


**Figura 23. Expresión de tinción relativa y localización de FLNA en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína FLNA en MLIn y MLT (asterisco rojo) y en la LP traqueal (asterisco azul) en ambos grupos. B) Expresión de la tinción positiva en el MLIn. C) Incremento significativo ( $p < 0.01$ ) para la tinción positiva en MLT de cobayos del modelo de asma alérgica. D) Incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en LP de cobayos del modelo de asma alérgica. Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, *t*'Student no pareada,  $n=5$



#### 4.3.2. Transgelina (TAGLN)

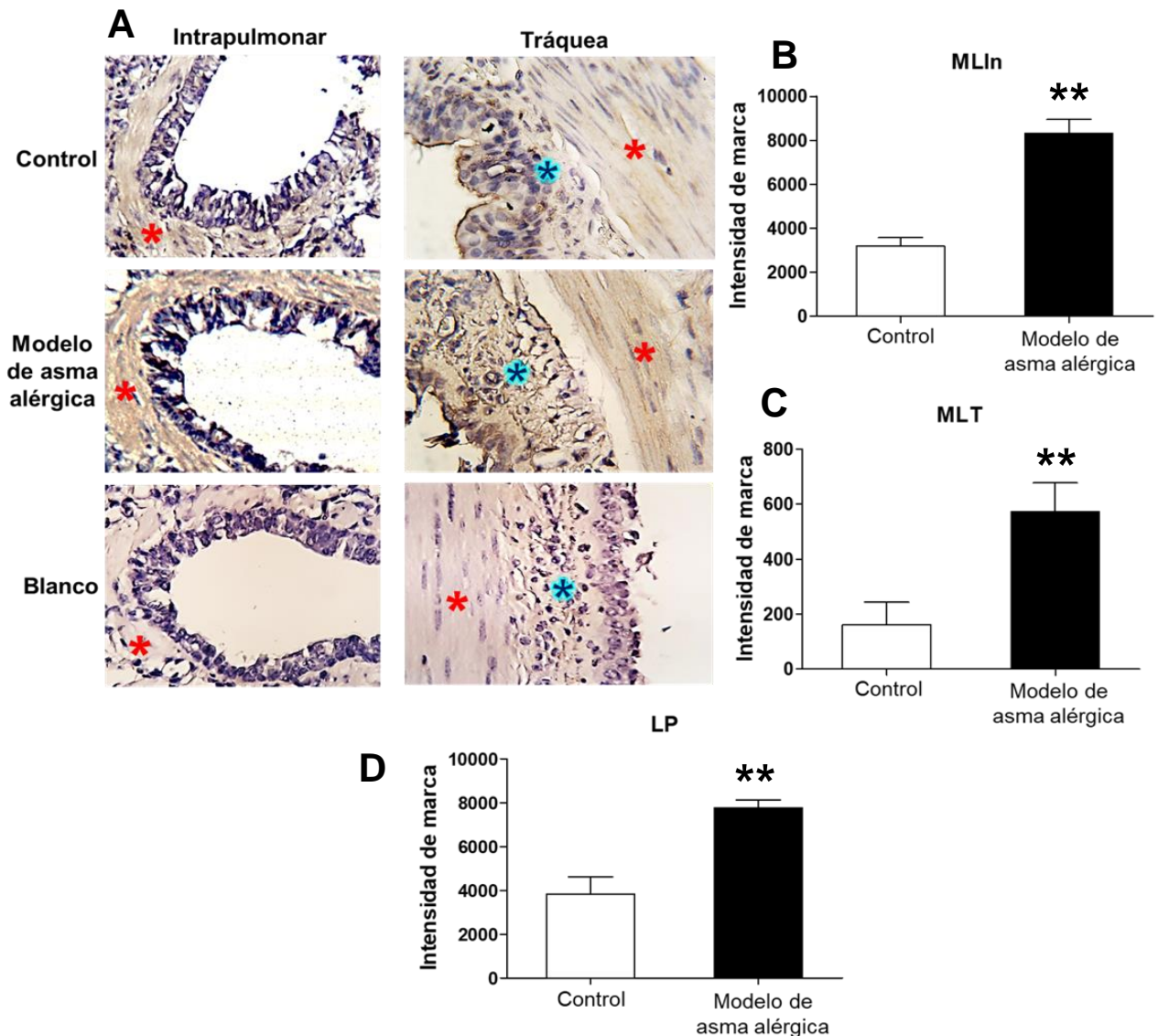
La proteína TAGLN también fue evaluada mediante IHC, en donde se pudo identificar su localización en el MLT y en MLIn, tanto de cobayos del modelo de asma alérgica como del grupo control (Fig. 24A). Sin embargo, el análisis de tinción relativa no reveló cambios significativos para la intensidad de marca de TAGLN en ninguna de las estructuras de músculo liso en donde fue localizada (Fig. 24B, 24C).



**Figura 24. Expresión de tinción relativa y localización de TAGLN en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína TAGLN en MLIn y MLT (asterisco rojo) en ambos grupos. B y C) Expresión de la tinción positiva en el MLIn y MLT respectivamente, en donde no se presentan diferencias significativas para la intensidad de marca de ambos grupos experimentales. *Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, t'Student no pareada  $p < 0.05$ ,  $n = 5$*

#### 4.3.3. Subunidad reguladora de la fosfatasa 1 dirigida al glucógeno (RG1)

El análisis para la localización por IHC de la proteína RG1 permitió identificarla en las estructuras de MLIn, MLT y LP de cobayos pertenecientes al grupo control y grupo del modelo de asma alérgica (Fig. 25A). El análisis en el programa ImageJ-Fiji identificó un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) para la intensidad de tinción positiva de RG1 en el MLIn, MLT, y LP de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control (Fig. 25B, 25C, 25D).



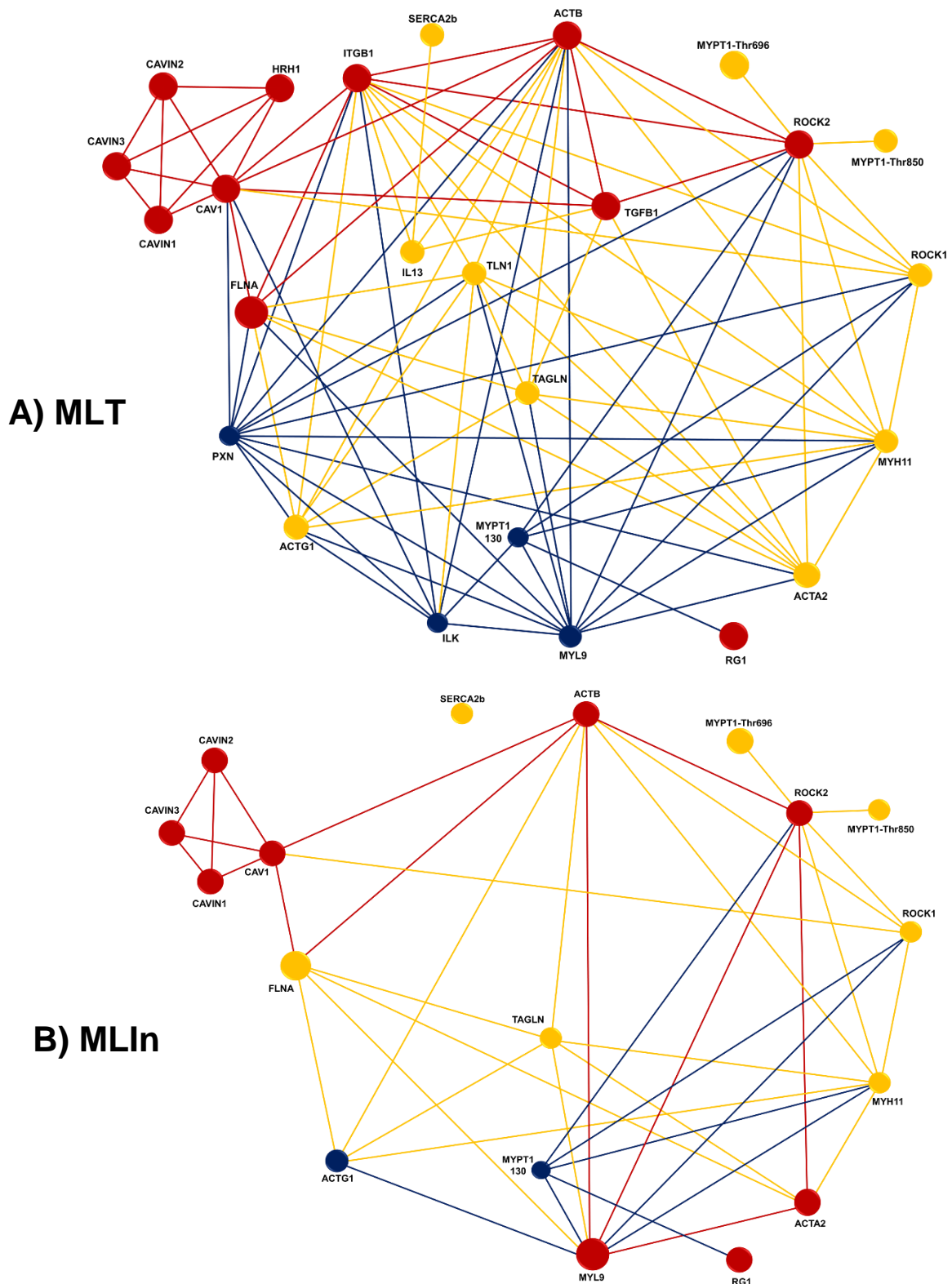
**Figura 25. Expresión de tinción relativa y localización de RG1 en tejido traqueal e intrapulmonar.** A) Micrografías muestran localización de la tinción positiva para la proteína en MLIn y MLT (asterisco rojo) y LP (asterisco azul) en ambos grupos. B) Incremento significativo de la intensidad de tinción positiva ( $p < 0.01$ ) en el MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica. C) Incremento significativo de la intensidad de tinción positiva ( $p < 0.01$ ) en el MLT de cobayos del modelo de asma alérgica. D) Incremento significativo de la intensidad de tinción positiva ( $p < 0.01$ ) en la LP de cobayos del modelo de asma alérgica. Para el grupo control (barra blanca) y modelo de asma alérgica (barra negra). Aumento 40X, *t* Student no pareada,  $n = 5$ .

## **5. Interacción y expresión de proteínas presentes en MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica**

El análisis de la presencia y expresión diferenciada por IHC de las proteínas presentes en el grupo del modelo de asma alérgica, permitió analizar más a fondo el posible comportamiento biológico de las proteínas identificadas en el MLIn. Lo anterior se realizó con el objetivo de dilucidar el papel de las principales proteínas de la maquinaria contráctil y su posible relación con la presencia o incremento de la contracción en el asma alérgica.

Como se observa en la Fig. 26, a partir de un análisis realizado en el software de la plataforma de libre acceso *STRING: Functional protein association networks*, se desarrollaron dos interactomas con base en la expresión de las proteínas analizadas por IHC, correspondientes a MYH11, MYL9, ACTA2, ACTB, ATG1, FLNA, TAGLN y RG1, así como con las proteínas que se han identificado dentro de las investigaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo para el MLVA. Dichas proteínas correspondieron a la cinasa asociada a la proteína Rho, en sus isoformas 1 y 2 (ROCK1 y ROCK2 respectivamente), la subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina 1 de 130 kDa (MYPT1) y sus formas fosforiladas en Thr-696 (MYPT1-Thr696) y Thr-850 (MYPT1-Thr850), ATPasa-2b del retículo sarcoplásmico (SERCA2b), caveolina 1 (CAV1), integrina  $\beta$ 1 (ITGB1), paxilina (PXN), talina (TLN1), cinasa ligada a integrinas (ILK), TGF- $\beta$ 1 (TGFB1), interleucina 13 (IL3), receptor de histamina 1 (HRH1), cavina 1 (CAVIN1), cavina 2 (CAVIN2) y cavina 3 (CAVIN). Todas las proteínas antes mencionadas y las analizadas en la presente tesis fueron identificadas en el MLT (Fig. 26A), mientras que sólo las proteínas MYH11, MYL9, ACTA2, ACTB, ATG1, FLNA, TAGLN, RG1, ROCK1, ROCK2, MYPT1, MYPT1-696, MYPT1-850, SERCA2b, CAV1, CAVIN1, CAVIN2 y CAVIN3 fueron identificadas en el MLIn (Fig. 26B). En el análisis de ambos interactomas, las proteínas fueron identificadas con círculos de diferente color correspondiente al comportamiento observado de expresión en el MLVA. Los círculos en color rojo corresponden a las proteínas que incrementan su expresión en el modelo de asma alérgica, los círculos en color amarillo identifican a las proteínas que no presentaron cambios entre los grupos de cobayos del modelo de asma alérgica y control, mientras que los círculos en color azul pertenecen a aquellas proteínas que disminuyen su expresión en el modelo de asma alérgica (Fig.26).

Ambos interactomas obtenidos presentaron valores para la probabilidad de interacción múltiple significativos, ( $p < 0.05$ ), con un valor de enriquecimiento de  $< 1.1 \times 10^{-6}$ , lo que hace referencia a que presentan un alto porcentaje de confianza de interacción. Además, el número de interacciones entre las proteínas fue más alto al esperado dentro de un conjunto aleatorio de proteínas con el mismo grado de distribución extraídas del genoma. Es decir, el enriquecimiento de las interacciones indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas biológicamente como un grupo de interacción.



**Figura 26. Interacción de proteínas de la maquinaria contráctil presente en el MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica.** Proteínas identificadas en el MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica. **A)** *Proteoma-interactoma MLT.* **B)** *Proteoma-interactoma MLIn.* Para ambos interactomas: círculos rojos: proteínas que incrementan su expresión, círculos amarillos: proteínas que no presentan cambios en comparación con el control y círculos azules: proteínas que disminuyen su expresión. *Interactoma realizado con base en los datos obtenidos por el programa STRING: Functional protein association networks, 2023.*



## DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad heterogénea que puede ser desencadenada por diversos factores genéticos y ambientales (GINA, 2023). Una de las características más importantes del asma es la HVA (Cockcroft y Davis, 2016). Actualmente, entender el funcionamiento de los principales mecanismos de señalización implicados en la HVA, tales como la contracción del MLVA, el inicio y desarrollo de la remodelación de las VA, así como la influencia del epitelio de las VA en éstos procesos, sigue siendo un reto para la fisiología, la biología celular y molecular (Chapman e Irvin, 2016). Sin embargo, los modelos animales han resultado útiles para dilucidar procesos importantes dentro de las características de la enfermedad (McGovern, 2014).

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, se demostró que un modelo de asma alérgica en cobayo presentaba muchas de las características observadas en los pacientes con asma, incluyendo la HVA (Bazán-Perkins et al., 2009). Por lo anterior, en la presente tesis, se desarrolló el modelo de asma alérgica en cobayo a partir de la exposición alérgica a la OVA propuesto por Bazán-Perkins y colaboradores en 2009. Además de identificar la respuesta obstructiva en los cobayos, se evaluó la reactividad de las VA a través de curvas de histamina (Bazán-Perkins et al., 2009).

Tal como se observa en el previo estudio de Bazán-Perkins y colaboradores en 2009, y en algunos otros, como el análisis realizado por Álvarez-Santos en 2015, nuestros cobayos del modelo de asma alérgica presentaron un incremento de la bronco-obstrucción de las VA y, además, incrementaron significativamente su valor de HVA comparado con el grupo control, por lo que se consideró a los cobayos del modelo de asma alérgica hiperreactores. Debido a que el componente principal de la HVA es el incremento de la contracción del MLVA, podríamos sugerir que el aumento de la HVA se encuentra directamente relacionado con un cambio directo en el mecanismo de la contracción del MLVA. Por lo anterior, la comprensión de la fisiología y la patología del asma alérgica, podría no solo incluir la identificación y el análisis de expresión e interacción de una proteína, sino de todo un conjunto de proteínas indispensables para el funcionamiento de la maquinaria contráctil.

La identificación por EM en sistemas MALDI-TOF-TOF ha resultado indispensable para el análisis de la expresión e identificación de proteínas en diversas enfermedades a partir de mapas proteómicos. Sin embargo, es necesario idear técnicas aún más específicas que permitan extrapolar los resultados obtenidos hacia la realidad biológica que se presenta en los tejidos y células (Wodak et al., 2009). Por lo anterior, a partir de un análisis electroforético de 1D y 2D del tejido traqueal de cobayos del modelo de asma alérgica y del grupo control, se determinó por EM, la presencia de algunas proteínas observadas en los geles de electroforesis, identificando 27 proteínas totales. Del total de proteínas identificadas, se seleccionaron 8 proteínas para ser analizadas por IHC involucradas ampliamente

tanto en el mecanismo de contracción como con la transmisión de la fuerza contráctil, correspondientes a MYH11, MYL9, ACTG1, ACTB, ACTA2, FLNA, TAGLN y RG1.

La inmunotinción para la proteína MYH11 permitió localizarla en las estructuras correspondientes al MLT, MLIn y en la LP para ambos grupos, en donde no se presentaron diferencias significativas de expresión. El gen *MYH11* codifica para todas las isoformas de cadenas pesadas de miosina involucradas en el mecanismo de contracción en diversos tipos de células musculares lisas, incluyendo el MLVA. Las diferentes isoformas de *MYH11* interactúan con los filamentos de actina dando paso a la contracción del músculo liso (Issouf et al., 2018). Diversas investigaciones se han dado a la tarea de evaluar el papel de MYH11 relacionado con la expresión y polimerización de filamentos gruesos, identificando un comportamiento diferente de la proteína en el mecanismo de contracción aparentemente dependiente del tejido que se analice (Kuang et al., 2012). Léguillette y col., en el año 2009 evaluaron la expresión de las subunidades de MYH11 en células de MLVA de biopsias bronquiales pertenecientes a pacientes con asma, en donde identificaron un incremento del ARNm de la proteína y su correlación positiva con el incremento de la velocidad de acortamiento del MLVA. Además, se reportó por IHC un incremento de la expresión de MYH11 en el asma (Léguillette et al. 2009). Por otro lado, la polimerización de filamentos gruesos de miosina suele presentarse a partir de la síntesis de *nov*o de la miosina y de la asociación de monómeros presentes en reservorios dentro del espacio intracelular del miocito. Lo anterior es activado inmediatamente al inicio del mecanismo de contracción. Una vez que la célula muscular es contraída, generalmente los filamentos de miosina suelen acortarse induciendo una disminución aparente de la proteína MYH11 (Wang et al., 2021). Cuando el MLVA se relaja, los filamentos de miosina suelen incrementar debido a la distensión que se presenta en la célula muscular, en donde la expresión de la miosina regresa a los niveles basales (Kuo et al., 2001; Wang et al., 2021). En nuestro análisis no identificamos diferencias significativas para la expresión de MYH11 en el MLIn ni en el MLT, lo que podría sugerir en primera instancia, que el aumento de la expresión de MYH11 no necesariamente se relacione con el incremento de la contracción sostenida en el asma alérgica. Además de lo anterior, se ha identificado que, el mantenimiento de la contracción por interacción de los filamentos de acto-miosina suele ser el detonante de múltiples procesos celulares relacionados con la tensión mecánica que pueden desencadenar la rigidez sostenida en el MLVA (Gunst, 2003).

Uno de los resultados mayormente relevantes fue la localización de MYH11 en la LP traqueal, en donde la expresión de la tinción positiva tampoco presentó diferencias significativas. A pesar de lo anterior, es la primera vez que se observa la localización de MYH11 fuera de la célula del MLVA. En reportes previos, se ha identificado a diversos componentes del citoesqueleto, incluyendo a la miosina, en

el espacio extracelular, localizados en estructuras conocidas como exosomas (Dai et al., 2020).

Los exosomas son un conjunto de vesículas formadas intracelularmente rodeadas por un fragmento de membrana plasmática. Estos exosomas pueden ser producto de la madurez previa de los llamados cuerpos multivesiculares (CMV), los cuales pueden regular la captación de diferentes materiales biológicos, incluidas las proteínas, con el fin de liberarlos hacia el espacio extracelular. Dentro de las proteínas presentes en los CMV se encuentran diferentes componentes intramembranales procedentes de la formación de endosomas, tales como las integrinas, así como componentes del citoesqueleto, actinas y miosinas (Dai et al., 2020). Según la base de datos proporcionada por Rouillard et al., 2016, existen aproximadamente 2629 proteínas localizadas en vesículas exosomales extracelulares, dentro de las que se encuentran las subunidades de MYH11. En el año 2014, Kwartler y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de MYH11 en músculo liso vascular inducido por el incremento de la contracción generaba un mecanismo de respuesta al estrés del retículo sarcoplásmico, en donde la necesidad de degradar a MYH11 conllevaba a la activación de una vía de señalización encargada de la expulsión exosomal de la proteína en el miocito. Lo anterior podría ser un ejemplo para explicar la localización de MYH11, en donde el incremento de componentes del citoesqueleto producto del aumento de la contracción, genere una respuesta en el MLT, que pueda liberar a la MYH11 hacia el espacio de la LP traqueal por medio de exosomas. De igual forma, la presencia de MYH11 en la LP podría ser mediada no solo por la secreción exosomal por parte del MLT, sino por la liberación dependiente del epitelio de las VA y de células fibroblásticas. Diversas investigaciones han reportado que, en ratones con asma, incrementa el número de vesículas extracelulares provenientes del epitelio comparadas con ratones sanos (Mohan et al., 2020). De igual forma, Gupta y col., en 2019 reportaron que las células epiteliales traqueo-bronquiales humanas con asma incrementan la secreción y captación de endosomas y exosomas, generando a su vez, un incremento de la patología de la enfermedad a través de un mayor depósito de mucina y remodelación de las VA. Por otro lado, los fibroblastos incrementan la secreción de exosomas en el asma, los cuales presentan componentes relacionados con la diferenciación hacia células de MLVA, lo que da paso a la liberación de componentes esenciales del citoesqueleto (Cañas et al., 2019). Todo lo anterior, identifica un nuevo paradigma para la localización de MYH11 en el tejido traqueal, además de demostrar que, el comportamiento de algunas de las proteínas en tejido traqueal y en tejido intrapulmonar, aparentemente es distinto.

En cuanto a la proteína MYL9, la inmunotinción permitió observarla sólo en el MLT y MLIn. Sin embargo, el comportamiento de expresión fue diferente en ambos músculos lisos, ya que incrementó en el MLIn, mientras que en el MLT se observó una disminución. El gen MYL9 es aquel que codifica a las cadenas ligeras de

miosina en el MLVA. La cadena ligera de miosina se fosforila durante el mecanismo de contracción activando el acortamiento del MLVA (Higashihara et al., 2008). En diferentes estudios en modelos animales que desarrollan asma, como el ratón, han identificado un incremento de MYL9 en pulmones expuestos a la sensibilización con OVA, incremento que también correlaciona con el aumento de la contracción del MLVA (Song et al., 2023). Lo anterior podría estar sucediendo en nuestro modelo de asma alérgica, en donde el incremento de la expresión de MYL9 en el MLIn pueda estar aumentando la contracción muscular. Sin embargo, esto no sucedería en MLT, ya que, contrario al MLIn, se observa una disminución significativa para la tinción positiva de MYL9. Algunos investigadores han reportado que, la disminución de MYL9 en el MLVA correlaciona directamente con la disminución de la contracción y de otros mecanismos tales como la proliferación y migración de las células musculares (Xu, 2011). El MLT es considerado un músculo que puede presentar contracción a partir de mecanismos de exposición a agentes contráctiles en un ambiente *ex vivo*, sin embargo, en ambientes *in vivo*, no se han identificado alteraciones relacionadas con el desarrollo del asma, características que sí se observan en el MLIn. Lo anterior propone que el MLT es un músculo que no suele presentar contracción en respuesta al mecanismo de bronco-obstrucción en el asma, ya que no presenta inflamación (Xiong et al., 2022). Esto sugeriría un papel intrascendente para el MLT en la respuesta del asma alérgica *in vivo*, pero resalta el interés de analizar los mecanismos que estarían siendo activados durante la disminución de MYL9.

### **1. Isoformas de actina**

En las células humanas se expresan seis isoformas de actina correspondientes a la actina  $\alpha$ -cardíaca (ACTC1),  $\alpha$ -esquelética (ACTA1),  $\alpha$ -de músculo liso (ACTA2),  $\gamma$ -entérica (ACTG2),  $\beta$ -citoplasmática (ACTB) y  $\gamma$ -citoplasmática (ACTG1), siendo las actinas citoplasmáticas marcadores importantes de las células proliferantes (Drummond and Friderici, 2013). Dada la importancia de las actinas en el mecanismo de contracción, se decidió evaluar a través de IHC a las actinas previamente identificadas por EM.

La inmunotinción para la actina ACTG1 permitió identificarla en las estructuras de MLIn, MLT, LP y epitelio de las VA de ambos grupos experimentales, identificando una disminución significativa de expresión de tinción en el MLIn. Además, ACTG1 puede ser identificada en células ciliadas epiteliales traqueales, así como en células polimorfonucleares. La proteína ACTG1 también es conocida como una isoforma de actina no muscular implicada en la activación de la motilidad y adhesión celular. En diversas investigaciones, se ha observado que la ACTG1 disminuye aproximadamente entre un 30-40% su expresión cuando se activa un evento de contracción del músculo liso (Zhang and Gunst, 2008). Dicha disminución abrupta de ACTG1 induce a su vez, un aumento en la fosforilación de las cadenas ligeras



de miosina a través de la activación de la vía de la cinasa asociada a Rho (ROCK), enzima que se ha relacionado con la inhibición directa de la MLCP y con la fosforilación de la MLC20; además de la inhibición de la migración y polaridad celular (Shum et al., 2011). Por lo anterior, la disminución de ACTG1 observada en el MLIn en el asma alérgica podría sugerir que es resultado de la activación de la contracción. A su vez, dicha disminución de ACTG1, podría estar induciendo el incremento en la activación de las vías de señalización que intervienen con la inhibición del mecanismo de relajación muscular y con el aumento de la contracción en el asma alérgica. Por otro lado, la localización de ACTG1 en células epiteliales ha sido reportada como parte de los principales genes del transcriptoma indispensables para el funcionamiento celular, tanto para la estructura celular como para la adhesión epitelial (Hackett et al., 2012). Por lo anterior, no es de extrañeza su localización en el epitelio del MLIn y MLT. Incluso, varios estudios han identificado a ACTG1 como componente importante para las uniones estrechas de la barrera epitelial (Ivanov et al., 2022). Además, la identificación más precisa de ACTG1 en las células ciliadas del epitelio traqueal, puede referirse a la participación de la proteína durante el mecanismo locomotor ciliar, puesto que lo anterior ha sido observado en investigaciones previas, como la realizada por Chhin y col., en el año 2008.

Por otro lado, la localización extracelular de ACTG1, es un dato que previamente se ha observado en varios tipos celulares y diversas enfermedades. Un ejemplo de lo anterior, es lo reportado en fibroblastos y células dañadas principalmente por los llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por "Damage Associated Molecular Pattern), en donde el estrés celular y la activación de apoptosis, conlleva a las células a implementar mecanismos de respuesta que expulsan proteínas de manera soluble al espacio extracelular, incluida ACTG1 (Garg et al., 2011; Denning and Fulton, 1988). Igualmente se ha informado que no solo las células dañadas, sino también las células sanas pueden liberar actinas hacia el espacio extracelular con el fin de interactuar con componentes de MEC, a través de la unión a proteínas que posibilitan el tráfico transmembranal, tal como sucede en algunas vías de localización "no canónica" de las actinas hacia el núcleo celular (Smalheiser, 1996; Accinni et al, 1983). Esta presencia de actinas "solubles" o "libres" que interactúan con la MEC, ha sido reportada para las células de músculo liso, en donde se han encontrado localizadas entre filamentos de fibras elásticas y fibronectina (Sudakov et al., 2017). Todo lo anterior, podría explicar la localización de ACTG1 en la LP de la tráquea en el asma alérgica, sin embargo, la función que desempeñaría sigue siendo incierta, dando paso a la necesidad de un mayor enfoque de investigación. Tampoco se descarta que ACTG1 sea expulsada por medio de exosomas al espacio extracelular, ya que, al igual que MHY11, ACTG1 también se encuentra dentro de las proteínas que se internalizan en estas estructuras de liberación (Rouillard et al., 2016).

Finalmente, la marca positiva de ACTG1 en células polimorfonucleares del tejido traqueal, podría deberse al papel relevante de la proteína en el mecanismo de migración, pues se ha informado que, en éstas células del sistema inmunológico, ATG1 es importante para la movilidad y migración celular (Kobayashi and DeLeo, 2009).

Con relación a la proteína ACTB, la inmunotinción permitió localizarla en las estructuras de MLT, MLIn y epitelio de las VA en ambos grupos experimentales. En donde, además, se observó un incremento significativo de la intensidad de tinción en el MLT y MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica comparado con el grupo control. La actina no muscular citoplasmática, ACTB, es una proteína que presenta relación con funciones celulares de crecimiento, división, motilidad, respuesta inmune, expresión génica, y formación del citoesqueleto en las células del músculo liso. La presencia de ACTB ha sido ampliamente relacionada con el incremento de la proliferación celular en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, así como al aumento de la formación de fibras de actina contráctil, de adhesiones focales y al incremento de la actividad de las cadenas de miosina (Suresh and Díaz, 2021). La localización celular de la red de actina citoplasmática, incluyendo ACTB, se encuentra presente en la interfaz de la membrana plasmática y el citoesqueleto, siendo de vital importancia para las interacciones dadas entre célula-célula y célula-MEC (Rao et al., 2012).

En el MLVA, ACTB forma una red de actina submembranosa o también llamada actina cortical, importante para conferir rigidez y plasticidad en respuesta a los estímulos externos y mecánicos (Zhang and Gunst, 2008). Lo anterior genera un aumento del montaje de todos los componentes partícipes en la formación de las adhesiones focales, estimulando la formación de fibras de actina, permitiendo una transmisión de la fuerza generada por los componentes de la contracción de acto-miosina hacia la MEC (Zhang and Gunst, 2008). Tal como se observa en el presente análisis, ACTB incrementa en cobayos del modelo de asma alérgica, lo que sugiere un aumento de la expresión de adhesiones focales y redes de filamentos de actina submembranales, que posiblemente confieran al MLVA una mayor rigidez durante y después del evento de contracción que se presenta en el asma alérgica.

En el año 2003, Gunst y Fredberg mencionaban acerca de un modelo celular para el MLVA conocido como “frío-caliente-frío” (por “cold-hot-cold”) en donde se propone que, la célula puede pasar de un estado “frío” a un estado caliente una vez que se genera la señal para el montaje de los componentes de la maquinaria contráctil en el citoesqueleto que induce la contracción del MLVA. En el punto “caliente” de la célula, además del complejo de contracción presente en el citoesqueleto, se da paso a la formación de los complejos de adhesomas, incluyendo la expresión de filamentos de actina cortical, principalmente formados por monómeros de ACTB. Lo anterior confiere un incremento de la rigidez del MLVA y por consiguiente una mayor fuerza contráctil. Después de que los componentes de acto-miosina interrumpen su interacción, la célula pasa de nuevo a un estado “frío” pero no basal, debido a que

los componentes submembranales y de adhesomas pueden seguir coexistiendo a pesar de que en el citoesqueleto no se presente activación (Gunst y Fredberg, 2003). Lo anterior, sugiere que dichos complejos de adhesomas podrían ser los culpables de que la célula no llegue a un pronto estado de relajación, mecanismo que podría estar presente en nuestro modelo de asma alérgica, en donde el incremento de actina cortical por filamentogénesis de ACTB, pudiera conferir a la célula del MLVA un estado tenso y rígido que impida una pronta relajación muscular en el asma alérgica.

En cuanto a la presencia de ACTB en el epitelio, varios reportes han identificado a la proteína como indispensable en la formación y mantenimiento de uniones adherentes de la barrera epitelial (Ivanov et al., 2022). Lo anterior ha sido observado en células epiteliales bronquiales pertenecientes al MLIn de pacientes con asma, tal como se presenta en nuestros datos obtenidos por IHC.

Por otro lado, ACTA2 es una actina presente en el músculo liso, a la cual se le ha relacionado con una función importante en el mecanismo de contracción de las células musculares lisas y de miofibroblastos (Suresh and Díaz, 2021). Como se puede observar en los resultados de esta tesis, la proteína ACTA2 se localizó en el MLT y MLIn de ambos grupos experimentales, además de incrementar su expresión en el MLIn de cobayos del modelo de asma alérgica. Ichikawa y col. en 2019, describieron a ACTA2 como un marcador importante para el incremento de la contracción y la remodelación irreversible de las VA en el asma grave (Ichikawa et al., 2019). Además de lo anterior, se ha demostrado que ACTA2 tiene relación con el aumento de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en el asma, incrementando a su vez el depósito de MEC, principalmente colágena (Liu et al., 2018; Ng et al., 2019), proteína que también fue identificada por EM. Por lo anterior, el incremento de ACTA2 sugiere un incremento de la filamentogénesis de actina del citoesqueleto durante el evento de contracción, lo que podría incrementar a su vez la interacción con los filamentos gruesos de miosina, lo que también explicaría, como se mencionó anteriormente, el incremento de MYL9 en el asma. Además, la relación que pudiese tener ACTA2 con la expresión de la colágena de la MEC, podría dilucidar una posible participación como marcador importante del inicio de la remodelación del MLVA. De igual forma, identificar el marcaje positivo de ACTA2 en fibroblastos podría abrir el estudio de su papel dentro del mecanismo de transición epitelio mesénquima en el asma alérgica.

## ***2. Proteínas relacionadas con la regulación de actinas y miosinas en el asma alérgica***

Además de evaluar a las principales proteínas que interaccionan en el citoesqueleto, decidimos analizar algunas otras relacionadas con la interacción de filamentos de actina y miosina, así como las relacionadas con la regulación de la relajación. En

primera instancia, se caracterizó la localización y expresión de tinción de la proteína FLNA.

FLNA fue localizada en las estructuras de MLIn, MLT y LP de cobayos del modelo de asma alérgica y cobayos control, en donde se observó un incremento significativo en el MLT y LP de cobayos del modelo de asma alérgica. La FLNA es una proteína encargada de la reticulación de los filamentos de actina, además de participar como andamiaje de diversas proteínas de señalización transmembranal, importantes para la morfología celular, adhesión a MEC, migración celular, así como para la detección y transmisión de la fuerza mecánica proveniente de la interacción de acto-miosina en el citoesqueleto (Iwamoto et al., 2018; Razinia et al., 2012). Por lo anterior, el incremento de FLNA presente en el MLT, podría tener un papel importante en la estabilización y reticulación de los filamentos de actina, principalmente de ACTB y ACTA2, ya que son los que se observan aumentados en el asma alérgica, permitiendo que la transmisión de la fuerza contráctil pueda estar siendo incrementada.

FLNA puede estar localizada principalmente en los complejos de adhesomas, aunque también puede interactuar con otras proteínas de la MEC. Incluso, algunas investigaciones han reportado que FLNA presenta regiones estructurales que le permiten no solo ser parte de los adhesomas, sino encontrarse de forma intramembranal, puesto que el extremo C-terminal de la proteína ha sido identificado en el espacio extracelular de algunos tipos celulares (Bachmann et al., 2006). De igual forma, se ha reportado que los dominios RGD de FLNA, que son aquellos dominios que interactúan directamente con algunas proteínas de MEC, tal como las fibras de colágena, fibronectina y las interinas, pueden encontrarse posicionados en el espacio extracelular presentando una interacción directa (Bachmann et al., 2006).

En el año 2016, como parte del estudio de nuestro grupo de trabajo, Álvarez-Santos y col., reportaron que las integrinas, principalmente la integrina  $\beta 1$ , es cortada a través de un mecanismo conocido como “shedding”, en donde, tanto los segmentos intracelulares como extracelulares de la integrina, son liberados de forma soluble al espacio extracelular (Álvarez-Santos et al., 2016). Por lo anterior, no se descarta que la interacción entre FLNA con la integrina  $\beta 1$ , genere un mecanismo de shedding, en donde FLNA sea “acarreada” por parte de la integrina  $\beta 1$  de forma soluble. Además de lo anterior, se ha reportado la asociación de FLNA con la inhibición de algunas metaloproteinasas, proteínas encargadas de “cortar” a las integrinas, incluida integrina  $\beta 1$ , tales como MMP2. Dicha asociación involucra directamente a FLNA con la activación del inhibidor TIMP2, el cual, a su vez, se encarga de regular negativamente a MMP2 (Baldassarre et al., 2012). En un estudio realizado también en nuestro grupo de trabajo, se sugirió que, en suero de pacientes con asma, la actividad de MMP2 podría estar disminuida impidiendo la expresión soluble de algunas integrinas (Téllez-Jiménez, 2017), por lo que tampoco se

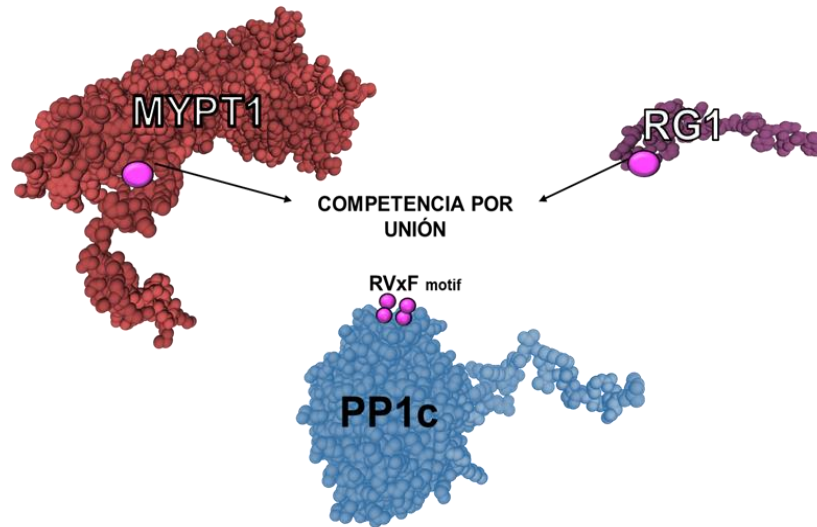
descarta que el incremento de la FLNA en la LP pueda ser la responsable de dicha inactivación de MMP2.

No es la primera vez que FLNA se observa fuera de la célula, ya que dicha localización se ha reportado para algunos casos de cáncer de pulmón (Gachechiladze et al., 2016). A pesar de lo anterior, aún no queda claro el mecanismo por el cual pueda presentarse de forma “soluble” en el espacio extracelular. Además, no se descarta que FLNA pueda ser liberada hacia el espacio extracelular por medio de exosomas, tal como sucede con MYH11 y ACTG1, puesto que la proteína también se ha reportado dentro de éstas estructuras (Rouillard et al., 2016).

Otra de las proteínas analizadas por IHC, fue la proteína TAGLN. Las inmunotinciones identificaron a TAGLN en el MLIn y MLT tanto en cobayos del modelo de asma alérgica como en cobayos del grupo control. Sin embargo, no se identificaron diferencias de expresión en ningún grupo experimental. La proteína TAGLN, al igual que FLNA, juega un papel importante en la unión y reticulación de los filamentos de actina, mediando el montaje de otras proteínas de unión a actina (Jo et al., 2018). Principalmente en el asma, se ha identificado que TAGLN aumenta su expresión en biopsias bronquiales de pacientes con asma leve, incrementando a su vez la remodelación de filamentos de actina y la HVA (Léguillette et al., 2009). Incluso, se ha observado que transgelina aumenta en el MLVA después del incremento de otras proteínas como tropomiosina y desmina (Yin et al., 2018; 2019), proteínas que también fueron identificadas por EM y que también han sido relacionadas con la interacción con los filamentos de actina. Sin embargo, nuestro estudio no identificó diferencias significativas para TGLN en el asma alérgica. Contrario, a lo antes mencionado, los mismos estudios realizados por Yin y col. en los años 2018-2019, también demuestran el papel de TAGLN como inactivador de la vía de señalización de RhoA-ROCK-MYPT1, lo que da paso a la activación de la MLCP, incrementando la relajación del MLVA. Lo anterior demuestra el papel controversial de TGLN dentro del mecanismo de contracción del MLVA en el asma, que si bien, en nuestro modelo de asma alérgica no podría ser relevante, abre la posibilidad del estudio y comportamiento de las proteínas identificadas que interaccionan directamente con TGLN, tales como tropomiosina y desmina.

Finalmente, el análisis realizado para la proteína RG1, mostró su localización en el MLIn, MLT y LP de ambos grupos experimentales, en donde se vio incrementada en todas las estructuras de cobayos del modelo de asma alérgica. La proteína RG1 es conocida como una de las subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa PP1c (Zhao and Lee, 1997) que dirige su actividad hacia la regulación de la síntesis el glucógeno en el músculo liso (Graham et al., 2010). En 1992, Alessi y col. caracterizaron una nueva subunidad reguladora, a la cual llamaron PP1M, que dirigía a la fosfatasa 1 hacia las cadenas ligeras de miosina. Ahora, dicha subunidad reguladora corresponde a la subunidad reguladora de la MLCP conocida como MYPT1 (Bruce and Bruce, 2009). En el mismo estudio, se demostró que la fosfatasa

dirigida al glucógeno disminuía su interacción cuando se presentaba un aumento de MYPT1 y viceversa, lo que pudiese implicar una inhibición de ambos complejos por competencia de las subunidades reguladoras por la subunidad catalítica PP1c (Fig. 28) (Alessi et al., 1992). De este modo, el incremento de RG1 en el MLVA del modelo de asma alérgica podría sugerir su implicación directa con la disociación del complejo de la MLCP por competencia con la subunidad reguladora MYPT1, induciendo una inhibición de la relajación del MLVA por el incremento de la fosforilación de las cadenas de miosina MLC20 (Fig. 28).



**Figura 27. Interacción y regulación de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina a través de sus subunidades reguladoras.** Esquema de la competencia entre la subunidad reguladora de la fosfatasa 1 de la cadena ligera de la miosina (MYPT1) y la subunidad reguladora de la fosfatasa 1 dirigida al glucógeno por el sitio de unión consenso RVxF de la subunidad catalítica PP1c. El incremento de RG1 suele inducir la inhibición de la interacción PP1c-MYPT1, inhibiendo la actividad de la MLCP. *Imagen propia basada en Alessi et al., 1992*

Por otra parte, RG1 fuera de la célula muscular no ha sido reportada de forma “soluble” en las VA. A pesar de lo anterior, RG1 es una subunidad dirigida principalmente a la síntesis de glucógeno, por lo que es posible que dicha proteína pueda colocalizar en zonas en donde se encuentre una cantidad considerable de glucógeno. Gabella en el año de 1991 identificó por medio de microscopía electrónica que los gránulos de glucógeno pueden ser exportados fuera de la célula y posicionarse en diferentes estructuras traqueales de cobayos, interaccionando con algunos componentes de la MEC (Raeburn and Giembycz, 2013). Los gránulos de glucógeno son estructuras esféricas también llamadas “glucasomas” formadas a partir de la interacción del glucógeno y los filamentos de actina citosólica, en los cuales se alberga toda la maquinaria necesaria para la síntesis de glucógeno, incluso, estudios de proteómica han identificado a RG1 como uno de los componentes principales de los glucasomas (Prats et al., 2018). De igual forma,

existen investigaciones que han relacionado el incremento de gránulos de glucógeno con el aumento de la proliferación celular de diversos tipos celulares traqueales, principalmente en el epitelio de las VA (Gaillard et al., 1989). Además, varios autores han reportado que los gránulos pueden encontrarse anclados a proteínas extracelulares como la mucina, proteína que ha estado presente en los tejidos de las VA, y que además incrementa en diferentes enfermedades, incluida el asma (Meyerholz et al., 2018). Sorprendentemente, se ha informado que la síntesis de gránulos de glucógeno puede incrementar en tejidos que previamente han tenido un evento de disminución de glucógeno, dando paso a la formación de glucosomas, los cuales también presentan una cantidad considerable de actina citosólica, como ACTB o ACTG1 (Prats et al., 2018). Finalmente, la forma aparente de exportación extracelular de los gránulos de glucógeno es a partir de microvesículas exosómicas. Por lo antes mencionado, podría sugerirse que la proteína RG1 está siendo exportada por éste medio hacia el espacio de la LP, quizás en respuesta al evento de contracción que se presenta en el asma alérgica.

### **3. Interacción y expresión de proteínas presentes en MLVA de cobayos del modelo de asma alérgica**

Una de las estrategias para lograr identificar vías de señalización alteradas en diversas enfermedades, incluida el asma, ha sido el empleo de mapas proteómicos y modelos de interacción entre proteínas conocidos como “interactomas”. Dichos interactomas pueden dilucidar no sólo el comportamiento de interacción física de las proteínas, si no también dar una idea del papel biológico que pudieran estar desempeñando dentro de un mecanismo como la contracción (Bell et al., 2022). Por lo anterior, a partir de la caracterización de las proteínas analizadas en la presente tesis por medio de IHC y de la búsqueda de proteínas investigadas previamente en nuestro grupo de trabajo presentes en el MLVA de cobayo, tanto en MLT como MLIN, se realizaron dos interactomas en el programa de libre acceso *STRING*.

Si bien en nuestros interactomas obtenidos la relación entre las proteínas puede ser sumamente amplia, el agrupamiento por vías de señalización resulta ser ideal para el análisis de interrelación del proteoma del MLVA. En primera instancia, existe un grupo de proteínas que se relaciona estrechamente con la interacción directa en la membrana plasmática del MLVA, principalmente posicionadas en zonas conocidas como balsas lipídicas y caveolas. Estas proteínas correspondientes a CAV1, CAVIN1, CAVIN2 y CAVIN3, se encargan de interaccionar con múltiples receptores acoplados a proteínas G conocidos como GPCRs (por “G protein-coupled receptors”) (Mocking et al., 2016). Dentro de estos receptores se encuentran los receptores HRH1, los cuales incrementan en el asma alérgica (Gutiérrez y Bazán, 2010) y resultan importantes para el incremento de la contracción del MLVA dependiente del incremento de histamina (Kelly et al., 2008). En los interactomas de MLT y MLIN, el incremento de CAV1 y las CAVIN 1,2 y3 reportado por Álvarez et

al., 2015, podría estar jugando un papel interesante con el incremento de la expresión de la proteína ITGB1, los HRH1 y la proteína ACTB.

An y colaboradores en el año 2002 hablaban de un mecanismo en el cual, la inhibición de la contracción por parte de la señalización de acto-miosina es independiente de la polimerización y rigidez producida por los filamentos de actina cortical, es decir, la inhibición de la contracción por desplazamiento de los filamentos de actina y miosina no interviene en la rigidez de las células de MLVA inducida por los filamentos de actina citoplasmática y contráctil analizadas en cultivo celular. Lo anterior también fue observado de manera inversa, en donde la despolimerización de los filamentos de actina cortical no interviene con el mecanismo y fuerza ejercida por la contracción de la maquinaria de acto-miosina (An et al., 2002). Dos años después, Smith y col. en 2005 llegaron a los mismos resultados propuestos por An y col. En esos resultados, Smith reafirmó que la remodelación y polimerización de la actina cortical en las células de MLVA en cultivo, podía ejercer la suficiente fuerza y rigidez a la célula muscular lisa independientemente del comportamiento de las cadenas de miosina (Smith et al., 2005). De igual forma, la interacción entre el citoesqueleto de actina y la MEC, puede dar paso a la generación de una tensión celular suficiente para mantener la transmisión de la fuerza contráctil producida por una única interacción de acto-miosina (Gunst et al., 2003; Smith et al., 2005). Por todo lo anterior, con base en el interactoma analizado en la presente tesis, se sugiere que, en el modelo de asma alérgica, el incremento de los filamentos de ACTB y ACTA2, podría estar regulando la rigidez excesiva de las células de MLVA dependiente de complejos de adhesomas, producida por un previo mecanismo de contracción de acto-miosina, induciendo un fenotipo hipercontráctil de las VA. Lo anterior también explicaría la interacción e incremento de ITGB1 y su interacción con la MEC en el asma alérgica, uno de los componentes principales de la remodelación de en la enfermedad (Álvarez et al., 2016). Sin embargo, la formación del macrocomplejo de adhesión a la membrana requiere de un conjunto de proteínas de andamiaje indispensables para su activación, incluidas las proteínas PXN, TLN1 e ILK (Zhang et al., 2012), las cuales se encuentran disminuidas en el asma alérgica. Lo anterior resulta controversial, pero abre la perspectiva para un nuevo objetivo de estudio.

Asimismo, las miosinas, tanto MYH11 como MYL9 resultan interaccionar con la mayoría de las proteínas en el interactoma, principalmente con los filamentos de actina, indispensable para la contracción en el citoesqueleto, así como con algunas cinasas que se relacionan con el incremento de la HVA, como es el caso de ROCK (Eslava y Álvarez, 2021). A pesar de que las cadenas de MYH11 no presentan cambios en el asma alérgica, el incremento de MYL9 y ACTA2, podría sugerir que la contracción puede incrementar, puesto que ambas proteínas son necesarias e imprescindibles para la interacción de acto-miosina. Además de lo anterior, en 2021, Eslava y Álvarez, reportaron que una de las proteínas reguladoras de la MLCP, la proteína ROCK2 incrementaba en el asma alérgica y correlacionaba directamente



con el desarrollo de la HVA. ROCK2 incrementa las formas fosforiladas de MYPT1-Thr696 (Álvarez et al., 2016), lo que genera la inactivación de la MLCP, inhibiendo la desfosforilación de la Ser<sup>19</sup> presente en MYL9. Lo anterior podría sugerir que, MYL9 no solo incrementa en el modelo de asma alérgica, sino que, además, se encuentre fosforilada en respuesta al mecanismo activado por ROCK2.

Finalmente, en nuestro modelo de asma alérgica, las citocinas IL13 e TGFβ1 identificadas en el MLVA podrían estar interaccionando directamente con la maquinaria contráctil. Si bien IL13 no presenta cambios de expresión, TGFβ1 incrementa y además interacciona directamente con proteínas del citoesqueleto, como ACTA2, con la ITGB1 y con la cinasa ROCK2. TGFβ1 no fue relacionada con la remodelación de las VA y la fibrosis subepitelial, pero su participación fue atribuida al incremento de proteínas contráctiles y activación elevada de la generación de la fuerza contráctil en el MLVA (Álvarez et al., 2022). Por lo anterior, es posible que TGFβ1 pueda estar mediando el incremento de la expresión de las proteínas de la maquinaria contráctil en el asma alérgica.

#### **4. Comportamiento diferencial de las proteínas en el MLIn y MLT**

Después del análisis de localización y expresión de las proteínas por medio de IHC, se pudo identificar un comportamiento diferencial entre las estructuras del tejido traqueal e intrapulmonar. Muchas de las investigaciones *ex vivo* para el asma, principalmente relacionadas con la farmacología del MLVA en general, son realizadas directamente en secciones de MLT de diferentes especies. La expresión de proteínas entre el MLIn y el MLT observado en la presente tesis, abre la interrogante sobre evaluar el comportamiento de la maquinaria contráctil y el mecanismo de contracción en el MLT para luego extrapolarlo al comportamiento presente en el MLIn en el asma alérgica. Lo anterior, no pretende desmeritar lo observado en el MLT en investigaciones previas, sin embargo, propone hacer énfasis en evaluar previamente el comportamiento tanto en el tejido traqueal, como en el tejido intrapulmonar de la proteína con la que se requiere trabajar no sólo en el asma alérgica, sino en muchas otras enfermedades.

## CONCLUSIÓN

- La expresión de MYH11 no necesariamente podría estar relacionada con el incremento de la contracción en el asma alérgica. Además, es la primera vez que se observa a MYH11 fuera de la célula del MLVA. Se sugiere que la liberación exosomal localice a MYH11 en la LP traqueal.
- El incremento de la expresión en el MLIn de MYL9, así como de su posible fosforilación por activación de la vía ROCK2 en el MLVA puede estar aumentando la contracción del músculo liso de las vías aéreas en el asma alérgica.
- El incremento de ACTB en el asma alérgica sugiere un aumento de la expresión de adhesiones focales y redes de filamentos de actina submembranales, confiriendo una mayor rigidez de las células de MLVA durante el evento de contracción en el asma alérgica. Además, ACTB en el epitelio, podría ser indispensable en las uniones adherentes de la barrera epitelial de las vías aéreas.
- El incremento de ACTA2 sugiere un incremento de la filamentogénesis de actina del citoesqueleto incrementando la interacción con los filamentos gruesos de miosina en el mecanismo de contracción.
- El incremento de FLNA podría ser importante para la estabilización y reticulación de los filamentos de actina, principalmente de ACTB y ACTA2, además, se sugiere que el mecanismo de “shedding” podría localizar a FLNA en el espacio extracelular debido a la asociación entre FLNA con la integrina  $\beta 1$ .
- Se descarta a TAGLN como una proteína indispensable para el incremento de la contracción en el asma alérgica.
- El incremento de RG1 en el MLVA del modelo de asma alérgica sugiere su implicación directa con la disociación del complejo de la MLCP, mientras que su localización fuera del MLT podría asociarse con la exportación extracelular de los gránulos de glucógeno a partir de micro vesículas exosómicas.
- El incremento de CAV1 y las CAVIN 1,2 y 3 podría estar aumentando la expresión de la proteína ITGB1, los HRH1 y la proteína ACTB en el asma alérgica.
- El incremento de ACTB y ACTA2 en estructuras submembranales podría regular el incremento de ITGB1 y su interacción con la MEC en el asma alérgica.
- TGF $\beta$ 1 podría estar mediando la expresión incrementada de las proteínas de la maquinaria contráctil en el asma alérgica.
- Las proteínas presentes en el tejido traqueal e intrapulmonar presentan un comportamiento diferente de localización y expresión, por lo que se propone hacer énfasis en evaluar previamente el comportamiento de la proteína con la que se requiere trabajar.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Analizar por medio de IHC las proteínas restantes que fueron identificadas por EM con la finalidad de incrementar la información del interactoma del MLVA en el modelo de asma alérgica.
- Determinar la localización de las proteínas en cuerpos extracelulares como los exosomas o gránulos de glucógeno en el asma alérgica.
- Evaluar la participación de las proteínas que forman parte del complejo de adhesomas submembranales dentro del mecanismo de tensión mecánica en el asma alérgica, tal como la proteína ACTB.
- Analizar la interacción entre la proteína FLNA con la ITGB1 en el espacio extracelular en el modelo de asma alérgica.
- Determinar la interacción entre las subunidades reguladoras de la fosfatasa 1 y su relación con la inhibición de la relajación del MLVA en el asma alérgica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accinni, L., Natali, P. G., Silvestrini, M., & De Martino, C. (1983). Actin in the extracellular matrix of smooth muscle cells. An immunoelectron microscopic study. *Connective tissue research*, 11(1), 69–78. <https://doi.org/10.3109/03008208309015012>

Alessi, D., Macdougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M., & Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. *European Journal of Biochemistry*, 210(3), 1023–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17508.x>

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

Álvarez-Santos, M. D., Álvarez-González, M., Eslava-De-Jesus, E., González-López, A., Pacheco-Alba, I., Pérez-Del-Valle, Y., Rojas-Madrid, R., & Bazán-Perkins, B. (2022). Role of airway smooth muscle cell phenotypes in airway tone and obstruction in guinea pig asthma model. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13223-022-00645-7>

Álvarez-Santos, M. D., Álvarez-González, M., Estrada-Soto, S., & Bazán-Perkins, B. (2020). Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Frontiers in physiology*, 11, 701. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00701>

Álvarez-Santos, M., Carbajal, V., Tellez-Jiménez, O., Martínez-Cordero, E., Ruiz, V., Hernández-Pando, R., Lascurain, R., Santibañez-Salgado, A., & Bazan-Perkins, B. (2016). Airway Hyperresponsiveness in Asthma Model Occurs Independently of Secretion of  $\beta$ 1 Integrins in Airway Wall and Focal Adhesions Proteins Down Regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 117(10), 2385–2396. <https://doi.org/10.1002/jcb.25536>

Alwarith, J., Kahleova, H., Crosby, L., Brooks, A., Brandon, L., Levin, S. M., & Barnard, N. D. (2020). The role of nutrition in asthma prevention and treatment. *Nutrition Reviews*, 78(11), 928–938. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa005>

An, S. S., Laudadio, R. E., Lai, J., Rogers, R. A., & Fredberg, J. J. (2002). Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(3), C792–C801. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00425.2001>

Bachmann, A. S., Howard, J. P., & Vogel, C. W. (2006). Actin-binding protein filamin A is displayed on the surface of human neuroblastoma cells. *Cancer science*, 97(12), 1359–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00327.x>

Baynes, J. W., & Dominiczak, M. H. (2019). *Bioquímica Médica*. Elsevier Health Sciences. <https://books.google.com.py/books?id=o-2KDwAAQBAJ>

Baldassarre, M., Razinia, Z., Brahme, N. N., Buccione, R., & Calderwood, D. A. (2012). Filamin A controls matrix metalloproteinase activity and regulates cell invasion in human fibrosarcoma cells. *Journal of cell science*, 125(Pt 16), 3858–3869. <https://doi.org/10.1242/jcs.104018>

Ball M., Hossain M., Padalia D. (2021). Anatomía, Vía aérea. (Actualizado el 31 de julio de 2021). En: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459258/>

Barnes P. J. (1998). Pharmacology of airway smooth muscle. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158(5 Pt 3), S123–S132. [https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement\\_2.13tac800](https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac800)

Barnes, J. L., & Gorin, Y. (2011). Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney international*, 79(9), 944–956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>

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

Bell, E. W., Schwartz, J. H., Freddolino, P. L., & Zhang, Y. (2022). PEPPI: Whole-proteome Protein-protein Interaction Prediction through Structure and Sequence Similarity, Functional Association, and Machine Learning. *Journal of molecular biology*, 434(11), 167530. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167530>

Berair, R., Saunders, R., & Brightling, C. E. (2013). Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. *BMC Medicine*, 11, 145. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-145>

Berend, N., Salome, C. M., & King, G. G. (2008). Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology*, 13(5), 624–631. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01330.x>

Black, J. L., Burgess, J. K., & Johnson, P. R. (2003). Airway smooth muscle--its relationship to the extracellular matrix. *Respiratory physiology & neurobiology*, 137(2-3), 339–346. [https://doi.org/10.1016/s1569-9048\(03\)00157-5](https://doi.org/10.1016/s1569-9048(03)00157-5)

Boulet, L. P., & Boulay, M. È. (2011). Asthma-related comorbidities. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 5(3), 377–393. <https://doi.org/10.1586/ers.11.34>

Bourke, J., Ammit, A., Burgess, J., Gosens, R., Halayko, A., Seow, C., & Hirst, S. (2022). Smooth Muscle Cells☆. In S. M. Janes (Ed.), *Encyclopedia of Respiratory*

Medicine (Second Edition) (pp. 37–51). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.00239-0>

Boxall, C., Holgate, S. T., & Davies, D. E. (2006). The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *The European respiratory journal*, 27(1), 208–229.  
<https://doi.org/10.1183/09031936.06.00130004>

Breeze, R. G., & Wheeldon, E. B. (1977). The cells of the pulmonary airways. *The American review of respiratory disease*, 116(4), 705–777.  
<https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705>

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

Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L. P., & Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(6), 1293–1298. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1557>

Chang, A. N., Gao, N., Liu, Z., Huang, J., Nairn, A. C., Kamm, K. E., & Stull, J. T. (2018). The dominant protein phosphatase PP1c isoform in smooth muscle cells, PP1c $\beta$ , is essential for smooth muscle contraction. *The Journal of biological chemistry*, 293(43), 16677–16686.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003083>

Chapman D. and Irvin C. (2016). Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in Asthma: the past, present and yet to come. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386586/>

Chapman, D. G., & Irvin, C. G. (2015). Mechanisms of airway hyper-responsiveness in asthma: the past, present and yet to come. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(4), 706–719.  
<https://doi.org/10.1111/cea.12506>

Chhin, B., Pham, J. T., El Zein, L., Kaiser, K., Merrot, O., & Bouvagnet, P. (2008). Identification of transcripts overexpressed during airway epithelium differentiation. *European Respiratory Journal*, 32(1), 121–128. doi:10.1183/09031936.00172107

Chronic Respiratory Diseases. (2008, July 10). Canada, P. H. A. of. (Navigation page). <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/chronic-respiratory-diseases.html>

Cockcroft D. W. y Davis B. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(3).  
[https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(06\)01511-9/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(06)01511-9/fulltext)

Cockcroft, D. W., Killian, D. N., Mellon, J. J., & Hargreave, F. E. (1977). Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clinical allergy*, 7(3), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1977.tb01448.x>

Cottrell J. S. (2011). Protein identification using MS/MS data. *Journal of proteomics*, 74(10), 1842–1851. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.014>

Crystal, R. G., Randell, S. H., Engelhardt, J. F., Voynow, J., & Sunday, M. E. (2008). Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 772–777. <https://doi.org/10.1513/pats.200805-041HR>

Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C., & Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 145. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>

Das, D., Wang, Y. H., Hsieh, C. Y., & Suzuki, Y. J. (2016). Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications. *Cellular signalling*, 28(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.007>

Davies, D. E., Wicks, J., Powell, R. M., Puddicombe, S. M., & Holgate, S. T. (2003). Airway remodeling in asthma: new insights. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(2), 215–226. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.128>

Davuluri, G., Seiler, C., Abrams, J., Soriano, A. J., & Pack, M. (2010). Differential effects of thin and thick filament disruption on zebrafish smooth muscle regulatory proteins. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(10), 1100-e285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01545.x>

Deng, J. T., Lierop, J. E. V., Sutherland, C., & Walsh, M. P. (2001). Ca<sup>2+</sup>-independent Smooth Muscle Contraction: A NOVEL FUNCTION FOR INTEGRIN-LINKED KINASE \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16365–16373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011634200>

Deng, M., Ding, W., Min, X., & Xia, Y. (2011). MLCK-independent phosphorylation of MLC20 and its regulation by MAP kinase pathway in human bladder smooth muscle cells. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), 68(3), 139–149. <https://doi.org/10.1002/cm.20471>

Denning, G. M., Kim, I. S., & Fulton, A. B. (1988). Shedding of cytoplasmic actins by developing muscle cells. *Journal of cell science*, 89 ( Pt 2), 273–282. <https://doi.org/10.1242/jcs.89.2.273>

Dhanjal, D. S., Sharma, P., Mehta, M., Tambuwala, M. M., Prasher, P., Paudel, K. R., Liu, G., Shukla, S. D., Hansbro, P. M., Chellappan, D. K., Dua, K., & Satija, S. (2022). Concepts of advanced therapeutic delivery systems for the management of

remodeling and inflammation in airway diseases. *Future medicinal chemistry*, 14(4), 271–288. <https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0081>

Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., McCormick, M., Woods, J., May, R., Sleeman, M. A., Anderson, I. K., & Brightling, C. E. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*, 138(5), 1140–1147. <https://doi.org/10.1378/chest.09-3058>

Donovan, G. M., Wang, K. C. W., Shamsuddin, D., Mann, T. S., Henry, P. J., Larcombe, A. N., & Noble, P. B. (2020). Pharmacological ablation of the airway smooth muscle layer—Mathematical predictions of functional improvement in asthma. *Physiological Reports*, 8(11), e14451. <https://doi.org/10.14814/phy2.14451>

Drummond, M. C., & Friderici, K. H. (2013). A novel actin mRNA splice variant regulates ACTG1 expression. *PLoS genetics*, 9(10), e1003743. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003743>

Effros, Richard. (2006). Anatomy, development, and physiology of the lungs. *GI Motility online*. Doi:10.1038/gimo73.

Eslava D.J.E. and Alvarez G.M. (2021) Papel de las proteínas ROCK1, ROCK2, MYPT1 y SERCA2b en la regulación de la hiperreactividad en el asma. Available at: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000813046&lang=es&site=eds-live> (Accessed: 10 June 2023).

Fang, L., Sun, Q., & Roth, M. (2020). Immunologic and Non-Immunologic Mechanisms Leading to Airway Remodeling in Asthma. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 757. <https://doi.org/10.3390/ijms21030757>

Finkelman, F. D., Hogan, S. P., Hershey, G. K., Rothenberg, M. E., & Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(4), 1663–1674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902185>

Gabella G. (1991). Ultrastructure of the tracheal muscle in developing, adult and ageing guinea-pigs. *Anatomy and embryology*, 183(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/BF00185837>

Gachechiladze, M., Skarda, J., Janikova, M., Mgebrishvili, G., Kharashvili, G., Kolek, V., Grygarkova, I., Klein, J., Poprachova, A., Arabuli, M., & Kolar, Z. (2016). Overexpression of filamin-A protein is associated with aggressive phenotype and poor survival outcomes in NSCLC patients treated with platinum-based combination chemotherapy. *Neoplasma*, 63(2), 274–281. [https://doi.org/10.4149/214\\_150224N108](https://doi.org/10.4149/214_150224N108)

Gaillard, D. A., Lallement, A. V., Petit, A. F., & Puchelle, E. S. (1989). In vivo ciliogenesis in human fetal tracheal epithelium. *The American journal of anatomy*, 185(4), 415–428. <https://doi.org/10.1002/aja.1001850405>



Gallant, C., Appel, S., Graceffa, P., Leavis, P., Lin, J. J., Gunning, P. W., Schevzov, G., Chaponnier, C., DeGnore, J., Lehman, W., & Morgan, K. G. (2011). Tropomyosin variants describe distinct functional subcellular domains in differentiated vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(6), C1356–C1365. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00450.2010>

Gao, Y., Ye, L. H., Kishi, H., Okagaki, T., Samizo, K., Nakamura, A., & Kohama, K. (2001). Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB life*, 51(6), 337–344. <https://doi.org/10.1080/152165401753366087>

Garg, A. D., Krysko, D. V., Vandenabeele, P., & Agostinis, P. (2011). DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 10(5), 670–680. <https://doi.org/10.1039/c0pp00294a>

55. Global Initiative for Asthma. (2023). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: <https://ginasthma.org/2023-gina-main-report/>

Graham, T. E., Yuan, Z., Hill, A. K., & Wilson, R. J. (2010). The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins. *Acta Physiologica*, 199(4), 489–498. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02131.x

Gunst, S. J. (2012). Chapter 104—Airway Smooth Muscle and Asthma. In J. A. Hill & E. N. Olson (Eds.), *Muscle* (pp. 1359–1369). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00104-6>

Gunst, S. J., & Fredberg, J. J. (2003). The first three minutes: Smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses. *Journal of Applied Physiology*, 95(1), 413–425. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00277.2003>

Gupta, R., Radicioni, G., Abdelwahab, S., Dang, H., Carpenter, J., Chua, M., Mieczkowski, P. A., Sheridan, J. T., Randell, S. H., & Kesimer, M. (2019). Intercellular Communication between Airway Epithelial Cells Is Mediated by Exosome-Like Vesicles. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 60(2), 209–220. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0156OC>

Gutiérrez A. G. F. and Bazán P. B.M. (2010) Expresión de receptores del músculo liso de las vías aéreas relacionados con el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma en *Cavia porcellus*. Available at: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000655272&lang=es&site=eds-live> (Accessed: 10 June 2023).

Hackett, N. R., Butler, M. W., Shaykhiev, R., Salit, J., Omberg, L., Rodriguez-Flores, J. L., Mezey, J. G., Strulovici-Barel, Y., Wang, G., Didon, L., & Crystal, R. G. (2012).

RNA-Seq quantification of the human small airway epithelium transcriptome. *BMC genomics*, 13, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-82>

Halayko, A. J., Salari, H., Ma, X., & Stephens, N. L. (1996). Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 270(6), L1040–L1051. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.6.L1040>

Halwani, R., Vazquez-Tello, A., Sumi, Y., Pureza, M. A., Bahammam, A., Al-Jahdali, H., Soussi-Gounni, A., Mahboub, B., Al-Muhsen, S., & Hamid, Q. (2013). Eosinophils induce airway smooth muscle cell proliferation. *Journal of clinical immunology*, 33(3), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9836-3>

Haslam, C., Hellicar, J., Dunn, A., Fuetterer, A., Hardy, N., Marshall, P., Paape, R., Pemberton, M., Resemannand, A., & Leveridge, M. (2016). The Evolution of MALDI-TOF Mass Spectrometry toward Ultra-High-Throughput Screening: 1536-Well Format and Beyond. *Journal of biomolecular screening*, 21(2), 176–186. <https://doi.org/10.1177/1087057115608605>

He, J. Q., Sandford, A. J., Wang, I. M., Stepaniants, S., Knight, D. A., Kicic, A., Stick, S. M., & Paré, P. D. (2008). Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *The European respiratory journal*, 32(3), 755–762. <https://doi.org/10.1183/09031936.00129107>

Higashihara, M., Watanabe, M., Usuda, S., & Miyazaki, K. (2008). Smooth muscle type isoform of 20 kDa myosin light chain is expressed in monocyte/macrophage cell lineage. *Journal of Smooth Muscle Research*, 44(1), 29–40. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.29>

Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat.* 2002 Oct;201(4):325-34. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00097.x. PMID: 12430957; PMCID: PMC1570917.

Holgate, S. T. (2008). Pathogenesis of Asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(6), 872–897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x>

Holroyde M. C. (1986). The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. *British journal of pharmacology*, 87(3), 501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1986.tb10192.x>

Hough, K. P., Curtiss, M. L., Blain, T. J., Liu, R.-M., Trevor, J., Deshane, J. S., & Thannickal, V. J. (2020). Airway Remodeling in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 7, 191. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00191>

Huo, R., Tian, X., Chang, Q., Liu, D., Wang, C., Bai, J., Wang, R., Zheng, G., & Tian, X. (2021). Targeted inhibition of  $\beta$ -catenin alleviates airway inflammation and remodeling in asthma via modulating the profibrotic and anti-inflammatory actions of

transforming growth factor- $\beta$ 1. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 15, 1753466620981858. <https://doi.org/10.1177/1753466620981858>

Ichikawa, T., Panariti, A., Audusseau, S., Mogas, A. K., Olivenstein, R., Chakir, J., Laviolette, M., Allakhverdi, Z., Heialy, S. A., Martin, J. G., & Hamid, Q. (2019). Effect of bronchial thermoplasty on structural changes and inflammatory mediators in the airways of subjects with severe asthma. *Respiratory Medicine*, 150, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.03.005>

Ijpma, G., Kachmar, L., Panariti, A., Matusovsky, O. S., Torgerson, D., Benedetti, A., & Lauzon, A. M. (2020). Intrapulmonary airway smooth muscle is hyperreactive with a distinct proteome in asthma. *The European respiratory journal*, 56(1), 1902178. <https://doi.org/10.1183/13993003.02178-2019>

Ijpma, G., Panariti, A., Lauzon, A.-M., & Martin, J. G. (2017). Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(6), L845–L854. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00353.2016>

Iriarte, C. F., Pascual, R., Villanueva, M. M., Román, M., Cortijo, J., & Morcillo, E. J. (1990). Role of epithelium in agonist-induced contractile responses of guinea-pig trachealis: influence of the surface through which drug enters the tissue. *British journal of pharmacology*, 101(2), 257–262. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb12697.x>

Issouf, M., Vargas, A., Boivin, R., & Lavoie, J. P. (2018). SRSF6 is upregulated in asthmatic horses and involved in the MYH11 SMB expression. *Physiological reports*, 6(20), e13896. <https://doi.org/10.14814/phy2.13896>

Ivanov, A. I., Lechuga, S., Marino-Melendez, A., & Naydenov, N. G. (2022). Unique and redundant functions of cytoplasmic actins and nonmuscle myosin II isoforms at epithelial junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1515(1), 61–74. <https://doi.org/10.1111/nyas.14808>

Iwamoto, D. V., Huehn, A., Simon, B., Huet-Calderwood, C., Baldassarre, M., Sindelar, C. V., & Calderwood, D. A. (2018). Structural basis of the filamin A actin-binding domain interaction with F-actin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(10), 918–927. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0128-3>

James, A. L., Elliot, J. G., Jones, R. L., Carroll, M. L., Mauad, T., Bai, T. R., Abramson, M. J., McKay, K. O., & Green, F. H. (2012). Airway Smooth Muscle Hypertrophy and Hyperplasia in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(10), 1058–1064. <https://doi.org/10.1164/rccm.201110-1849OC>

- Jo, S., Kim, H.-R., Mun, Y., & Jun, C.-D. (2018). Transgelin-2 in immunity: Its implication in cell therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 104(5), 903–910. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR1117-470R>
- Jong, P. A. de, Müller, N. L., Paré, P. D., & Coxson, H. O. (2005). Computed tomographic imaging of the airways: Relationship to structure and function. *European Respiratory Journal*, 26(1), 140–152. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00007105>
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S379–S388. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707604>
- Knizner, K. T., Bagley, M. C., Pu, F., Elsen, N. L., Williams, J. D., & Muddiman, D. C. (2022). Normalization techniques for high-throughput screening by infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*, 57(6), e4869. <https://doi.org/10.1002/jms.4869>
- Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 1(3), 309–333. <https://doi.org/10.1002/wsbm.32>
- Kuang, S. Q., Kwartler, C. S., Byanova, K. L., Pham, J., Gong, L., Prakash, S. K., Huang, J., Kamm, K. E., Stull, J. T., Sweeney, H. L., & Milewicz, D. M. (2012). Rare, nonsynonymous variant in the smooth muscle-specific isoform of myosin heavy chain, MYH11, R247C, alters force generation in the aorta and phenotype of smooth muscle cells. *Circulation research*, 110(11), 1411–1422. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261743>
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., & Aoki, I. (2013). Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology*, 4, 263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00263>
- Kuo, K. H., Wang, L., Paré, P. D., Ford, L. E., & Seow, C. Y. (2001). Myosin thick filament lability induced by mechanical strain in airway smooth muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(5), 1811–1816. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.5.1811>
- Kwartler, C. S., Chen, J., Thakur, D., Li, S., Baskin, K., Wang, S., Wang, Z. V., Walker, L., Hill, J. A., Epstein, H. F., Taegtmeier, H., & Milewicz, D. M. (2014). Overexpression of smooth muscle myosin heavy chain leads to activation of the unfolded protein response and autophagic turnover of thick filament-associated proteins in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 289(20), 14075–14088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499277>
- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., & Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease.

Physiological Reviews, 97(4), 1555–1617.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2017>

Lan, B., Mitchel, J. A., O'Sullivan, M. J., Park, C. Y., Kim, J. H., Cole, W. C., Butler, J. P., & Park, J. A. (2018). Airway epithelial compression promotes airway smooth muscle proliferation and contraction. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 315(5), L645–L652.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00261.2018>

Lauzon, A. M., & Martin, J. G. (2016). Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-306.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7422.1>

Léguillette, R., Laviolette, M., Bergeron, C., Zitouni, N., Kogut, P., Solway, J., Kachmar, L., Hamid, Q., & Lauzon, A.-M. (2009). Myosin, Transgelin, and Myosin Light Chain Kinase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), 194–204. <https://doi.org/10.1164/rccm.200609-1367OC>

LeMessurier, K. S., Tiwary, M., Morin, N. P., & Samarasinghe, A. E. (2020). Respiratory Barrier as a Safeguard and Regulator of Defense Against Influenza A Virus and *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Immunology*, 11.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00003>

Liu, D., Pan, J., Zhao, D., & Liu, F. (2018). MicroRNA-223 inhibits deposition of the extracellular matrix by airway smooth muscle cells through targeting IGF-1R in the PI3K/Akt pathway. *American journal of translational research*, 10(3), 744–752.

Liu, Z., & Khalil, R. A. (2018). Evolving Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction Highlight Key Targets in Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology*, 153, 91–122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>

Malavia, N. K., Raub, C. B., Mahon, S. B., Brenner, M., Panettieri, R. A., Jr, & George, S. C. (2009). Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 41(3), 297–304.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0358OC>

Matthew, A., Shmygol, A., & Wray, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biological Research*, 37(4), 617–624.  
<https://doi.org/10.4067/S0716-97602004000400017>

Mauri, P., Riccio, A. M., Rossi, R., Di Silvestre, D., Benazzi, L., De Ferrari, L., Dal Negro, R. W., Holgate, S. T., & Canonica, G. W. (2014). Proteomics of bronchial biopsies: galectin-3 as a predictive biomarker of airway remodelling modulation in omalizumab-treated severe asthma patients. *Immunology letters*, 162(1 Pt A), 2–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.010>

McGovern, A. E., & Mazzone, S. B. (2014). Guinea pig models of asthma. *Current protocols in pharmacology*, 67, 5.26.1–5.26.38.

Meleady P. (2011). 2D gel electrophoresis and mass spectrometry identification and analysis of proteins. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 784, 123–137. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-289-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-289-2_9)

Meleady P. (2018). Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1664, 3–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7268-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7268-5_1)

Meurs, H., Gosens, R., & Zaagsma, J. (2008). Airway hyperresponsiveness in asthma: Lessons from in vitro model systems and animal models. *European Respiratory Journal*, 32(2), 487–502. <https://doi.org/10.1183/09031936.00023608>

Meyerholz, D. K., Beck, A. P., Goeken, J. A., Leidinger, M. R., Ofori-Amanfo, G. K., Brown, H. C., Businga, T. R., Stoltz, D. A., Reznikov, L. R., & Flaherty, H. A. (2018). Glycogen depletion can increase the specificity of mucin detection in airway tissues. *BMC research notes*, 11(1), 763. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3855-y>

Mindt, B. C., Fritz, J. H., & Duerr, C. U. (2018). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 9, 840. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00840>

Mocking, T., Bosma, R., Rahman, S. N., Verweij, E. W. E., McNaught-Flores, D. A., Vischer, H. F., & Leurs, R. (2016). Molecular Aspects of Histamine Receptors. In P. Blandina, & M. B. Passani (Eds.), *Histamine Receptors. Preclinical and clinical aspects.* (pp. 1-49). (The Receptors; No. 28). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40308-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40308-3_1)

Mohan, A., Agarwal, S., Clauss, M., Britt, N. S., & Dhillon, N. K. (2020). Extracellular vesicles: novel communicators in lung diseases. *Respiratory research*, 21(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01423-y>

Ng, B., Dong, J., D'Agostino, G., Viswanathan, S., Widjaja, A. A., Lim, W.-W., Ko, N. S. J., Tan, J., Chothani, S. P., Huang, B., Xie, C., Pua, C. J., Chacko, A.-M., Guimarães-Camboa, N., Evans, S. M., Byrne, A. J., Maher, T. M., Liang, J., Jiang, D., ... Cook, S. A. (2019). Interleukin-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Translational Medicine*, 11(511). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw1237>

Ng, E. W., Wong, M. Y., & Poon, T. C. (2014). Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. *Topics in current chemistry*, 336, 139–175. [https://doi.org/10.1007/128\\_2012\\_413](https://doi.org/10.1007/128_2012_413)

Ng, H. H., Shen, M., Samuel, C. S., Schlossmann, J., & Bennett, R. G. (2019). Relaxin and extracellular matrix remodeling: Mechanisms and signaling pathways. *Molecular and cellular endocrinology*, 487, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.015>

- Olczyk, P., Mencner, Ł., & Komosinska-Vassev, K. (2014). The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. *BioMed Research International*, 2014, 747584. <https://doi.org/10.1155/2014/747584>
- Ouédraogo, N., & Roux, E. (2014). Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *Journal of Pulmonary and Respiratory Medicine*, 4.
- Paizs, B., & Suhai, S. (2005). Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass spectrometry reviews*, 24(4), 508–548. <https://doi.org/10.1002/mas.20024>
- Petelski, A. A., Emmott, E., Leduc, A., Huffman, R. G., Specht, H., Perlman, D. H., & Slavov, N. (2021). Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nature protocols*, 16(12), 5398–5425. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00616-z>
- Prats, C., Graham, T. E., & Shearer, J. (2018). The dynamic life of the glycogen granule. *The Journal of biological chemistry*, 293(19), 7089–7098. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.802843>
- Raeburn D. and Giembycz M. A. (2013). Airways Smooth Muscle: Structure, Innervation and Neurotransmission. *Respiratory Pharmacology and Pharmacotherapy*. Birkhäuser. 332 pp. [https://books.google.com.mx/books?id=8hzyBwAAQBAJ&dq=glycogen+in+lamina+propria+airways&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.mx/books?id=8hzyBwAAQBAJ&dq=glycogen+in+lamina+propria+airways&source=gbs_navlinks_s)
- Rao, J. N., Rivera-Santiago, R., Li, X. E., Lehman, W., & Dominguez, R. (2012). Structural analysis of smooth muscle tropomyosin  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 287(5), 3165–3174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307330>
- Razinia, Z., Mäkelä, T., Ylännä, J., & Calderwood, D. A. (2012). Filamins in mechanosensing and signaling. *Annual Review of Biophysics*, 41, 227–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102252>
- Reddel, H. K., Bacharier, L. B., Bateman, E. D., Brightling, C. E., Brusselle, G. G., Buhl, R., Cruz, A. A., Duijts, L., Drazen, J. M., FitzGerald, J. M., Fleming, L. J., Inoue, H., Ko, F. W., Krishnan, J. A., Levy, M. L., Lin, J., Mortimer, K., Pitrez, P. M., Sheikh, A., Yorgancioglu, A. A., ... Boulet, L. P. (2022). Global Initiative for Asthma Strategy 2021: Executive Summary and Rationale for Key Changes. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 205(1), 17–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.202109-2205PP>
- Ren, Y., Li, M., Bai, S., Kong, L., & Su, X. (2021). Identification of histone acetylation in a murine model of allergic asthma by proteomic analysis. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 246(8), 929–939. <https://doi.org/10.1177/1535370220980345>
- Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets

gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database (Oxford). pii: baw100.

Sanderson, M. J., Delmotte, P., Bai, Y., & Perez-Zogbhi, J. F. (2008). Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca<sup>2+</sup> signaling and sensitivity. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(1), 23–31. <https://doi.org/10.1513/pats.200704-050VS>

Schwartz, A. S., Yu, J., Gardenour, K. R., Finley, R. L., Jr, & Ideker, T. (2009). Cost-effective strategies for completing the interactome. *Nature methods*, 6(1), 55–61. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1283>

Shum, M. S. Y., Pasquier, E., Po'uha, S. T., O'Neill, G. M., Chaponnier, C., Gunning, P. W., & Kavallaris, M. (2011).  $\gamma$ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway. *The FASEB Journal*, 25(12), 4423–4433. <https://doi.org/10.1096/fj.11-185447>

Smalheiser N. R. (1996). Proteins in unexpected locations. *Molecular biology of the cell*, 7(7), 1003–1014. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.7.1003>

Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G., & Grütter, P. (2005). Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: stiffening induced by contractile agonist. *Biophysical journal*, 88(4), 2994–3007. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046649>

Snider J., Kotlyar M., Saraon P., Yao Z., Jurisica I., Stajlgjar I. Fundamentals of protein interaction network mapping. *Mol Syst Biol*. 2015 Dec 17;11(12):848. doi: 10.15252/msb.20156351. PMID: 26681426; PMCID: PMC4704491.

Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *The Journal of physiology*, 522 Pt 2(Pt 2), 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00177.x>

Song, Y., Jiang, J., Bai Q., Liu S., Zhang Y., Xu C., Piao H., Li L. and Yan G. (2023). Gene expression profiles and bioinformatics analysis in lung samples from ovalbumin-induced asthmatic mice. *BMC Pulm Med* 23, 50. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02306-w>

Spina D. (1998). Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158 (5Pt3), S141–S145. [https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement\\_2.13tac100a](https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac100a)

Sudakov, N. P., Klimenkov, I. V., Byvaltsev, V. A., Nikiforov, S. B., & Konstantinov, Y. M. (2017). Extracellular Actin in Health and Disease. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(1), 1–12. <https://doi.org/10.1134/S0006297917010011>



Suresh, R., & Diaz, R. J. (2021). The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Translational Oncology*, 14(6), 101051. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101051>

Swan, A. L., Mobasher, A., Allaway, D., Liddell, S., & Bacardit, J. (2013). Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. *Omics : a journal of integrative biology*, 17(12), 595–610. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0017>

Swartz, M. A., Tschumperlin, D. J., Kamm, R. D., & Drazen, J. M. (2001). Mechanical stress is communicated between different cell types to elicit matrix remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6180–6185. <https://doi.org/10.1073/pnas.111133298>

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>

Tang, D. D. (2015). Critical role of actin-associated proteins in smooth muscle contraction, cell proliferation, airway hyperresponsiveness and airway remodeling. *Respiratory Research*, 16, 134. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0296-1>

Téllez-Jiménez, O. (2017). Niveles de integrinas en circulación sanguínea en asma bronquial. Tesis: Maestría en Ciencias Biológicas, Biomedicina. UNAM. Biblioteca UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2017/abril/0758317/Index.html>

Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>

Tsuchida, S., Umemura, H., & Nakayama, T. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(20), 4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>

Turner, C. T., Fuller, M., Hopwood, J. J., Meikle, P. J., & Brooks, D. A. (2016). Drug induced exocytosis of glycogen in Pompe disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 479(4), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.145>

Vetterkind S., Morgan K. G. (2012). “Regulation of smooth muscle contraction,” in *Muscle*, eds Hil J. A., Olson E. N. (London: Elsevier; ), 1173–1180.

Von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M. A., & Bork, P. (2005). STRING: known and predicted protein-

protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D433–D437. <https://doi.org/10.1093/nar/gki005>

Walther, T. C., & Mann, M. (2010). Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of cell biology*, 190(4), 491–500. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004052>

Wang, L., Chitano, P., & Seow, C. Y. (2021). Filament evanescence of myosin II and smooth muscle function. *The Journal of general physiology*, 153(3), e202012781. <https://doi.org/10.1085/jgp.202012781>

Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27(4), 201–206. doi:10.1152/advan.00025.2003

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

Wittekindt O. H. (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 469(1), 135–147. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1917-3>

Wodak, S. J., Pu, S., Vlasblom, J., & Séraphin, B. (2009). Challenges and rewards of interaction proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8(1), 3–18. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800014-MCP200>

Woodman, L., Siddiqui, S., Cruse, G., Sutcliffe, A., Saunders, R., Kaur, D., Bradding, P., & Brightling, C. (2008). Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(7), 5001–5007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.5001>

Wu, T. D., Brigham, E. P., & McCormack, M. C. (2019). Asthma in the Primary Care Setting. *The Medical clinics of North America*, 103(3), 435–452. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.004>

Xiong, D. J. P., Martin, J. G., & Lauzon, A. M. (2022). Airway smooth muscle function in asthma. *Frontiers in physiology*, 13, 993406. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.993406>

Xu W, Hong W, Shao Y, Ning Y, Cai Z, Li Q. (2011). Nogo-B regulates migration and contraction of airway smooth muscle cells by decreasing ARPC 2/3 and increasing MYL-9 expression. *Respir Res*.12(1):14.

Yang, Y. C., Zhang, N., Van Crombruggen, K., Hu, G. H., Hong, S. L., & Bachert, C. (2012). Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy*, 67(10), 1193–1202. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02880.x>

Yin, L. M., Ulloa, L., & Yang, Y. Q. (2019). Transgelin-2: Biochemical and Clinical Implications in Cancer and Asthma. *Trends in biochemical sciences*, 44(10), 885–896. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.05.004>

Yin, L. M., Xu, Y. D., Peng, L. L., Duan, T. T., Liu, J. Y., Xu, Z., Wang, W. Q., Guan, N., Han, X. J., Li, H. Y., Pang, Y., Wang, Y., Chen, Z., Zhu, W., Deng, L., Wu, Y. L., Ge, G. B., Huang, S., Ulloa, L., & Yang, Y. Q. (2018). Transgelin-2 as a therapeutic target for asthmatic pulmonary resistance. *Science translational medicine*, 10(427), eaam8604. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam8604>

Zhang, W., & Gunst, S. J. (2008). Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(1), 32–39. <https://doi.org/10.1513/pats.200704-048VS>

Zhang, W., & Gunst, S. J. (2008). Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(1), 32–39. <https://doi.org/10.1513/pats.200704-048VS>

Zhang, W., Huang, Y., & Gunst, S. J. (2012). The small GTPase RhoA regulates the contraction of smooth muscle tissues by catalyzing the assembly of cytoskeletal signaling complexes at membrane adhesion sites. *The Journal of biological chemistry*, 287(41), 33996–34008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369603>

Zhao, S., & Lee, E. Y. C. (1997). A Protein Phosphatase-1-binding Motif Identified by the Panning of a Random Peptide Display Library \*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28368–28372. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28368>

Zhou, Q. T., Sun, Y. C., & Yao, W. Z. (2005). Characteristics of the airway inflammation and the relationship to interleukin-17 in severe asthma. *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 28(9), 630–634.