



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**EXPRESIÓN DE LAS INTEGRINAS BETA-1
SOLUBLES DURANTE LA REMODELACIÓN
SUBEPITELIAL
DE LAS VÍAS AÉREAS
EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA**

T E S I S

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

PATRICIA RAMOS RAMÍREZ

TUTORA

Dra: BLANCA M. BAZÁN PERKINS



MÉXICO

2007



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.

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno (a) Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	Ramos Ramírez Patricia 5513 9458 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30129933-6
2.- Datos del tutor (a) Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins
3.- Datos del sinodal 1 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	Dra. María de Lourdes Segura Valdéz
4.- Datos del sinodal 2 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	Dr. Erasmo Martínez Cordero
5.- Datos del sinodal 3 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	M en C Diana Elodia Aguilar León
6.- Datos del sinodal 4 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	Biól. Edgar Sánchez Guerrero
7.- Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año	“Expresión de las integrinas beta-1 durante la remodelación subepitelial de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica”. 40 2007



Este trabajo se realizó en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, bajo la asesoría de la Dra. Blanca M. Bazán Perkins y con el apoyo parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de proyecto 52356.

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE, QUIEN CON SU AMOR, APOYO Y PACIENCIA ME
HA IMPULSADO A CONCLUIR UNA META EN MI CAMINO

A ARTURO VARELA, MI VIDA

A LA DRA. BLANCA M. BAZÁN POR EL TIEMPO Y PACIENCIA
QUE HA TENIDO DURANTE MI FORMACIÓN CIENTÍFICA Y
PARA LA ELABORACIÓN DE ESTE PROYECTO

AL BIOL. EDGAR SÁNCHEZ GUERRERO POR SU APOYO Y
ASESORÍA EN LA ELABORACIÓN DE ESTE PROYECTO

Y PRINCIPALMENTE A DIOS, QUE HA PUESTO EN MI CAMINO
A TAN HERMOSAS PERSONAS Y ME HA DADO
EL ALIENTO DE CADA DÍA

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
Antecedentes.....	9
Inflamación de las vías aéreas.....	10
Inflamación aguda.....	10
Inflamación crónica.....	12
Hiperreactividad.....	12
Obstrucción de las vías aéreas.....	13
Músculo liso.....	13
Edema.....	13
Moco.....	14
Cambios estructurales de las vías aéreas.....	14
Integrinas.....	15
Subunidad beta-1 de integrina.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Animales.....	20

Procedimiento de sensibilización.....	20
Día 1: sensibilización.....	20
Pletismografía.....	20
Día 8: Refuerzo antigénico.....	20
Día 15: Primer reto.....	21
Retos subsecuentes.....	22
Reactividad de las vías aéreas.....	22
Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar.....	23
Histología convencional y análisis morfométrico automatizado.....	24
Detección inmunohistoquímica de la subunidad beta-1 de integrina, α -actina y vimentina en las vías aéreas.....	24
Microscopía electrónica.....	25
Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1 Obstrucción de las vías aéreas inducida por ovoalbúmina en cobayos sensibilizados.....	26
6.2 Reactividad de las vías aéreas.....	27
6.3 Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar.....	27
6.4 Efecto de la estimulación crónica con el alergeno en la estructura de las vías aéreas.....	28

6.4.1	Análisis de la tinción histológica de estructuras subepiteliales.....	28
6.4.2	Estructura de la mucosa subepitelial y músculo liso por análisis morfológico automatizado.....	29
6.4.3	Expresión de la subunidad beta-1 de integrina.....	30
7	DISCUSIÓN.....	33
8	CONCLUSIONES.....	36
9	REFERENCIAS.....	37

ABREVIATURAS

Abreviatura

β 1
Al (OH₃)
CPA
CPH II
Ctrl
DP₂₀₀
DP₂₀
Fc ϵ RI
FEV₁
H/E
H₂O₂
i.p.
íB
Ig
IL
LBA
LTC₁/LTD₄
MB
MEC
min
mM
MMP
n
NaCl
OVA
PBS
Penh
PGD₂
Rmax
rpm
SSF
TGF- β
T_H2
VA

Significado

Subunidad beta-1 de integrina
Hidróxido de aluminio
Célula presentadora de antígeno
Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II
Control
Dosis provocativa basal 200
Dosis provocativa 20
Receptor de IgE de alta afinidad
Volumen espiratorio forzado en un segundo
Hematoxilina/eosina
Peróxido de hidrógeno
Intraperitoneal
Índice de broncoobstrucción
Inmunoglobulina
Interleucina
Lavado bronquioalveolar
Leucotrienos C₁/D₄
Membrana basal
Matriz extracelular
Minutos
Milimolar
Metaloproteinasas
Tamaño de la muestra
Cloruro de sodio
Ovoalbúmina
Solución amortiguadora salina de fosfatos
Enhanced Pause
Prostaglandina D₂
Respuesta máxima
Revoluciones por minuto
Solución salina fisiológica
Factor de crecimiento transformante beta
Linfocitos T cooperadores clase 2
Vías aéreas

RESUMEN

El asma alérgica está caracterizada por episodios recurrentes y reversibles de bronco-obstrucción, inflamación de las vías aéreas e hiperreactividad bronquial en respuesta a varios estímulos. El proceso de remodelación subepitelial de las vías aéreas que se desarrolla durante la enfermedad, se caracteriza por la acumulación excesiva de componentes alterados de la matriz extracelular; sin embargo, el impacto fisiológico de este reordenamiento morfológico sobre la función respiratoria aún es motivo de controversia. En este trabajo, se describen los efectos estructurales y funcionales producidos por provocaciones repetitivas con alérgeno en cobayos sensibilizados. Se utilizaron cobayos machos de la raza Hartley sensibilizados a la ovoalbúmina que fueron retados repetidamente con el antígeno a intervalos de diez días. La reactividad a la histamina y los cambios inmunohistopatológicos de las vías aéreas se evaluaron en el día del refuerzo antigénico y en el primer, tercer, y noveno retos. Se incluyeron dos grupos control de cobayos de edad correspondiente al primer y noveno retos a los que solo se les administró solución salina fisiológica durante los retos. Cada grupo contó con al menos cinco cobayos. Los controles de edad no presentaron cambios estructurales ni funcionales significativos. A partir del día del refuerzo antigénico, los cobayos presentaron eosinofilia en el lavado bronquioalveolar y desde el primer reto, broncoobstrucción transitoria (que al menos triplicó el valor basal) e hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina. Todas estas alteraciones mantuvieron la misma magnitud hasta el noveno reto. El índice de broncoobstrucción basal obtenido antes de los retos se fue incrementando progresivamente hasta alcanzar significancia estadística en el noveno reto ($P < 0.05$). El análisis morfométrico de los bronquiolos mostró un aumento significativo ($P < 0.05$) del área de músculo liso en el décimo reto y una progresiva acumulación de colágena en la mucosa subepitelial. Los bronquios no presentaron modificaciones morfométricas. Por otro lado, se estudió la expresión de integrinas ya que están involucradas en la migración y retención de células inflamatorias de la circulación hacia las vías aéreas, lo que ocasiona la persistencia de la inflamación; además la subunidad beta-1, expresada en músculo liso y fibroblastos en las vías aéreas, regula múltiples respuestas celulares que contribuyen al proceso fibrótico. Se observó en los controles y hasta el tercer reto la misma expresión de la subunidad beta-1 de integrina en la adventicia, mucosa subepitelial y músculo liso. Esta expresión aumentó significativamente ($P < 0.01$) en el noveno reto, tanto en el músculo liso como en áreas celulares y no celulares de la mucosa subepitelial. En las áreas celulares de la mucosa subepitelial la sobreexpresión de beta-1 se asoció con algunas células inflamatorias y mesenquimales (positivas a vimentina), pero no con células que expresaran α -actina o proteína de neurofilamento. Las imágenes de inmunomicroscopía electrónica mostraron que la localización de la subunidad beta-1 de integrina en áreas acelulares esta asociada con las colágenas tipo I y tipo II. Los resultados de este estudio indican que la hiperreactividad de las vías aéreas y la broncoobstrucción inducida por el reto antigénico, aparecen y se mantienen con la misma magnitud de respuesta

independientemente del engrosamiento progresivo de la pared de las vías aéreas. En este trabajo se describe por primera vez que las integrinas podrían encontrarse de manera soluble (no asociadas a células) en la matriz extracelular. Dichas integrinas beta-1 solubles podrían estar involucradas en el mecanismo homeostático que modula la magnitud de las respuestas funcionales de las vías aéreas independientemente de la remodelación existente, pero también pueden contribuir con la fibrosis subepitelial. Una posible consecuencia de los cambios estructurales en los animales crónicamente expuestos a la provocación con alérgeno es el aumento de la broncoobstrucción basal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las vías aéreas (VA) consisten en una serie de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran en el pulmón, y cuya función es conducir el aire hacia las regiones de intercambio gaseoso (*Fig. 1*) [1]. Las paredes de las VA están recubiertas por una capa de epitelio seguida por tejido conectivo, músculo liso y cartílago [2]. Conforme las VA se hacen más estrechas, como en los bronquiolos, el cartílago desaparece y en regiones cercanas a las áreas de intercambio respiratorio, como en los bronquiolos terminales, el músculo liso disminuye de manera importante. Los componentes estructurales de la pared de las VA se pueden dividir en los pertenecientes a la mucosa y en los de la submucosa. El epitelio, la membrana basal (MB) y la lámina propia corresponden a la mucosa, mientras que el músculo liso, el cartílago y la adventicia son catalogadas como submucosa (*Fig. 2*) [3].

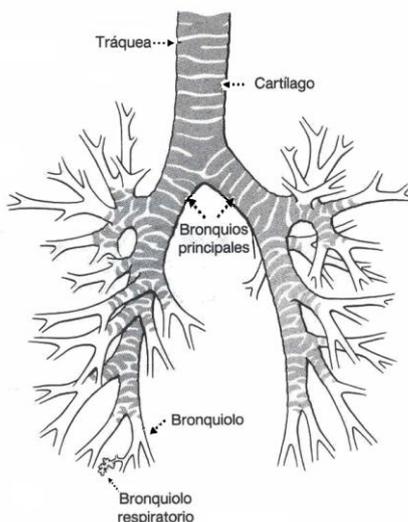


Figura 1. Estructura de las vías aéreas de mamífero.
(Tomado de Randall D, et al. 1997 [4])

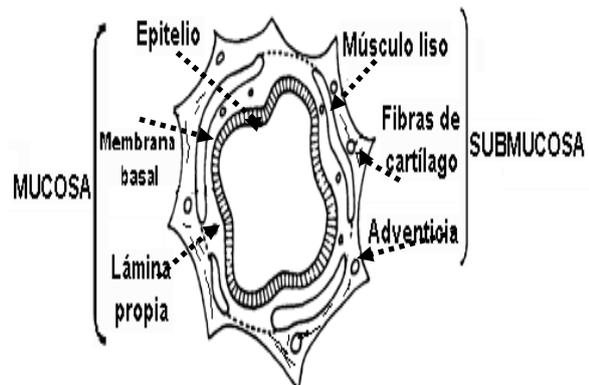


Figura 2. Diagrama de las vías aéreas y sus compartimentos.
(Modificado de Wang L, 2003 [5])

Basada en su fisiopatología, el asma se define como un desorden inflamatorio crónico de las VA. La inflamación crónica está asociada con el incremento en la reactividad de estas vías a una variedad de estímulos [6-9] y con episodios recurrentes de síntomas respiratorios como tos, expectoración, disnea, sibilancias y sensación de opresión torácica, particularmente por la noche y la mañana. Estos síntomas están relacionados con la obstrucción reversible del flujo de aire [7,9-14].

Clásicamente, se ha dividido al asma en dos tipos: extrínseca e intrínseca. El asma extrínseca se produce por una reacción de hipersensibilidad inmediata inducida por la exposición a un antígeno externo [15,16]. Este tipo de asma, conocida también como atópica o

alérgica, se ha asociado con la predisposición genética de un individuo para producir inmunoglobulina E (IgE) específica para alérgenos comunes [7,17,18]. Por otro lado, el asma intrínseca se origina por mecanismos no alérgicos, como pueden ser la ingestión de aspirina, infecciones pulmonares, irritantes inhalados, ejercicio o estrés y se ha sugerido que puede ser una forma de autoinmunidad o autoalergia debido a la activación anormal de linfocitos. El asma intrínseca es menos frecuente que la extrínseca, y salvo por la presencia de atopia en el asma alérgica, el asma no alérgica es clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similar al asma alérgica [6,15,16].

Los factores involucrados en el desarrollo y expresión clínica del asma son muy heterogéneos. El inicio de la enfermedad generalmente es asintomático y ocurre cuando algún factor desencadenante, que suele ser ambiental, afecta las VA de un individuo susceptible hasta desencadenar un proceso inflamatorio [7,17,19]. La respuesta celular alterada producida por la inflamación desencadena varios de los síntomas de la enfermedad, es por esto que a la inflamación se le considera uno de los componentes más importantes de la fisiopatogenia del asma [7,14,20].

1.2 Inflamación de las vías aéreas

La inflamación es un proceso fundamental para reparar y restaurar la estructura y función de los tejidos dañados [9,11,14,21-23]. En el asma, la inflamación involucra a numerosos tipos celulares, tanto células residentes de las VA como un infiltrado celular inmune definido, así como diversos mediadores químicos liberados por estas células [7,14].

La secuencia de acontecimientos que dan lugar a una respuesta alérgica en las VA y a la inflamación, inicia cuando un alérgeno es captado por las células presentadoras de antígeno (CPA), principalmente células dendríticas y macrófagos, ubicadas en la mucosa traqueobronquial. Estas células degradan al alérgeno y unen los fragmentos al complejo principal de histocompatibilidad (CPH), una proteína que portan sobre su membrana, para después presentarlos a un linfocito T cooperador inmaduro (T_H0) activándolo. Una vez que el linfocito T_H0 es activado, se diferencia a linfocito T cooperador clase dos (T_H2) el cual estimula a los linfocitos B para producir IgE específica para el alérgeno que desencadenó la respuesta. Cuando la IgE se une a receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$), que se encuentran sobre células cebadas y basófilos, el individuo se ha sensibilizado al alérgeno. La expresión del asma es un evento posterior que se inicia cuando se presenta de nuevo el alérgeno y es reconocido por el anticuerpo IgE sobre la célula sensibilizada (*Fig. 3*) [7,9,24].

1.2.1 Inflamación aguda

La reacción de fase inmediata, o inflamación aguda, se inicia después de la activación de las células sensibilizadas debido a la exposición repetida al mismo alérgeno. Las células activadas liberan mediadores proinflamatorios como la histamina, triptasa, leucotrienos (LTC_1 , LTD_4) y prostaglandinas (PGD_2) que inducen la dilatación e incremento de la permeabilidad de los

vasos sanguíneos de las VA, estimulan terminales nerviosas y secreción de moco, desencadenando los síntomas de la enfermedad alérgica (Fig. 4) [7,9,11,15,25].

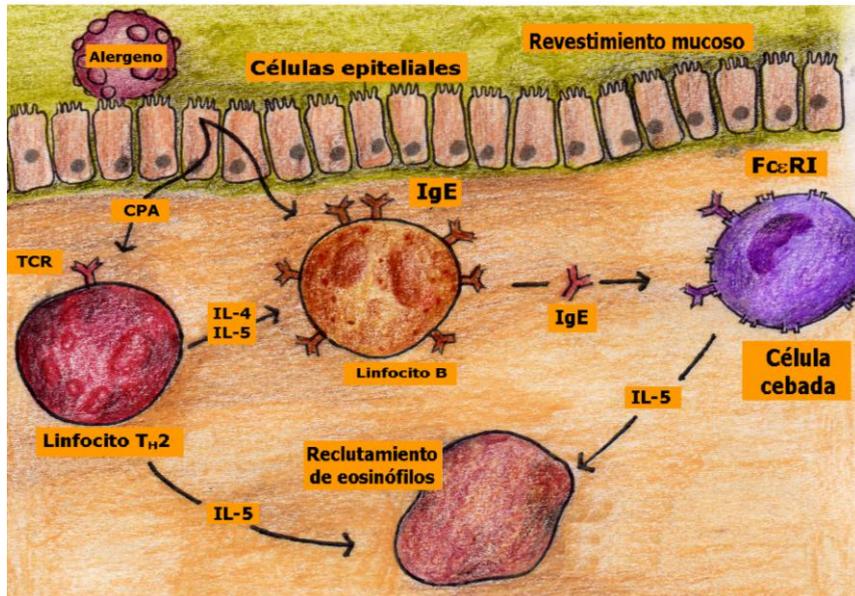


Figura 3. Sensibilización alérgica. Los alérgenos inhalados (antígeno) inducen una respuesta de tipo T_H2 con producción de IgE la cual se une a células portadoras del FcεRI, lo que conlleva al reclutamiento de eosinófilos (Modificado de Cotran RS, 1997 [15]).

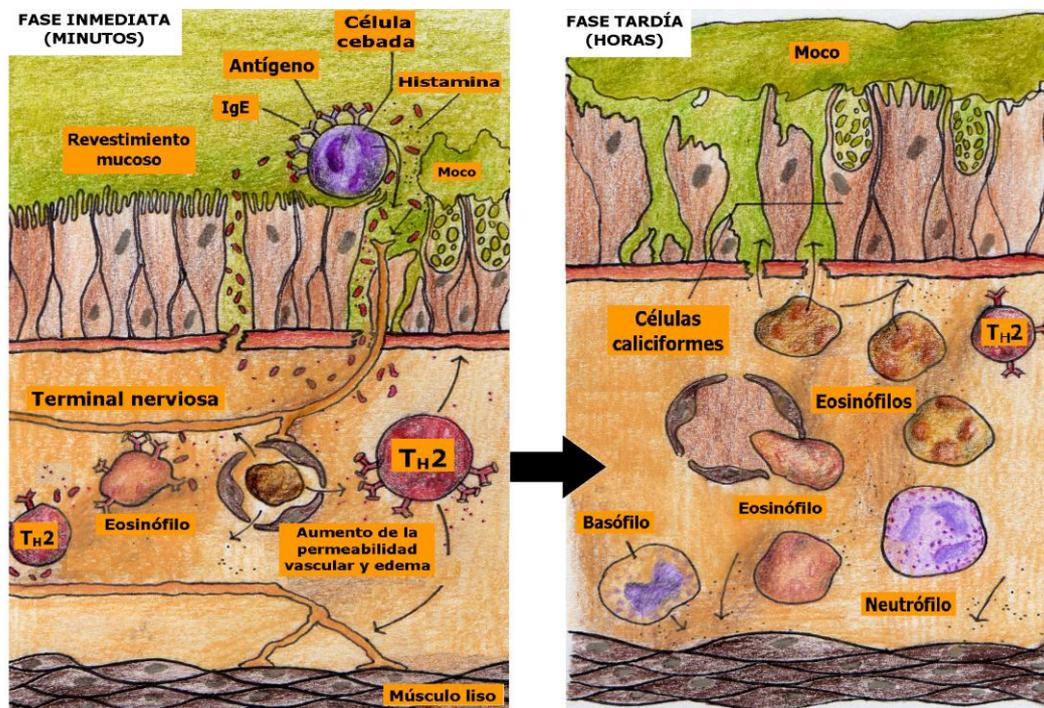


Figura 4. Mecanismos de inflamación en asma alérgica. Tras la nueva exposición al antígeno, la reacción inmediata es desencadenada por la unión de IgE a sus receptores sobre células cebadas, las cuales liberan mediadores preformados que abren las uniones entre las células epiteliales, por lo que el antígeno puede introducirse en la mucosa y activar a células cebadas y eosinófilos que liberan mediadores adicionales. Estos mediadores directamente o por reflejos neuronales inducen broncoespasmo, aumentan la permeabilidad vascular y la producción de moco. La llegada de nuevas células reclutadas inicia la fase tardía y una nueva liberación de mediadores que lesionan el epitelio y llevan a la persistencia del proceso inflamatorio (Modificado de Cotran RS, 1997 [15]).

La reacción de fase tardía involucra la proliferación, reclutamiento y activación de eosinófilos, linfocitos T_H2 , neutrófilos, macrófagos y basófilos hacia las VA debido a la liberación de citocinas, como son las interleucinas (IL) 4, IL-5 e IL-2 liberadas durante la fase inmediata (*Fig. 4*), por lo que se desarrolla una segunda respuesta obstructiva [7,9,24,26]. Los eosinófilos generalmente dominan el tipo de células inflamatorias, pero los neutrófilos pueden prevalecer durante el comienzo de los síntomas de asma y en casos de asma severa [13,27,28].

1.2.2 Inflamación crónica

Las células inflamatorias son retenidas, reclutadas y activadas en las VA mediante la expresión de moléculas de adhesión y mediadores químicos. Este fenómeno origina la persistencia de la inflamación ocasionando la perpetuación de la enfermedad [7-9,11].

La infiltración celular inicia cuando las células migran debido a que fueron activadas por alguna señal. Una vez que las células se encuentran circulando por los vasos, se adhieren a las paredes vasculares a través de moléculas de adhesión, para luego extravasarse mediante diapédesis. Finalmente, se da la quimiotaxis, mediante la cual se dirigen al sitio donde se están generando las señales pro-inflamatorias [21]. Se ha sugerido también la presencia de poros en la membrana basal de las VA que pueden ser utilizados como conducto para la migración de células inflamatorias [29]. Por otro lado, la liberación de mediadores químicos por las células inflamatorias causan la ruptura de la barrera epitelial facilitando el pasaje antigénico a la submucosa y permitiendo el ingreso de mediadores broncoconstrictores y mediadores que provocan extravasación vascular e hipersecreción de moco [7,17,26,30].

Una importante consecuencia funcional de la inflamación es que induce la inestabilidad de las VA, haciendo que el calibre de esta estructura se reduzca rápida y fácilmente por estímulos tanto endógenos como exógenos, fenómeno conocido como hiperreactividad de las VA [7,14,17,20,25].

1.3 Hiperreactividad de las vías aéreas

Una característica fundamental, mas no exclusiva del asma, es la hiperreactividad de las VA. En general se puede definir a la hiperreactividad como el incremento de la sensibilidad de las VA a agonistas que provocan contracción del músculo liso como la histamina, la acetilcolina, los leucotrienos y las prostaglandinas [17,18,20,31]. Algunos de los síntomas del asma observados después de un estímulo físico (ejercicio, hiperventilación de aire frío o caliente) o químico (alergenos, agentes irritantes o fármacos) son manifestaciones de la hiperreactividad de las VA [6,17].

La hiperreactividad de las VA puede evaluarse clínicamente utilizando flujometría, espirometría o pletismografía. En estas evaluaciones se suelen administrar al paciente dosis conocidas de un agente broncoconstrictor y se mide la función pulmonar, habitualmente espiración forzada (volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV_1)) [1,32]. Uno de los fármacos de mayor uso para estas evaluaciones es la histamina [17,32].

La histamina es un compuesto de bajo peso molecular almacenado en los gránulos de células cebadas y uno de los mediadores más importantes de la hipersensibilidad inmediata. Al unirse a sus receptores de histamina H1 se incrementa la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso de las VA contribuyendo a la exudación de plasma hacia las VA y al broncoespasmo [33]. La hiperreactividad se puede expresar en términos de la dosis provocativa 20 (PD₂₀), que es la concentración del fármaco a la cual se produce una disminución del 20% de la función respiratoria habitual (Fig. 5) [6,17,32,34].

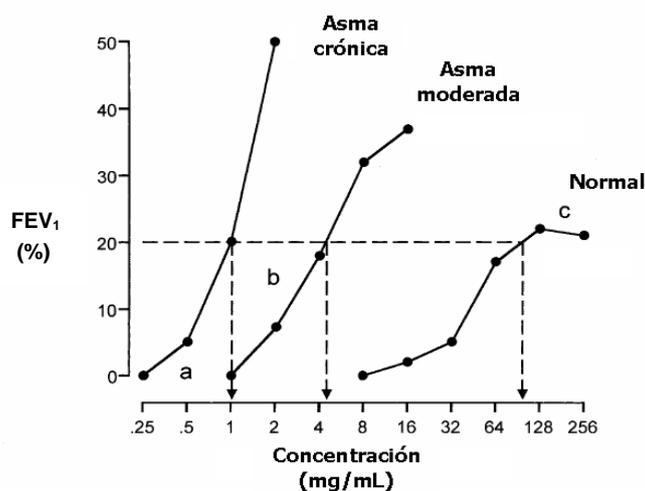


Figura 5. Curva dosis-respuesta que muestra los cambios en el volumen espiratorio forzado (FEV₁) inducido por distintas dosis del agonista. En individuos con asma crónica la respuesta obstructiva se inicia por una pequeña cantidad del agonista llevando a una respuesta umbral reducida (a), en un individuo con asma moderada la curva presenta una elevada inclinación, lo que indica un incremento en la sensibilidad de las VA por el agente (b), mientras que un individuo sano tiene una respuesta máxima a una concentración mayor del agonista (c). Tomado de O'Byrne P & Inman LP, 2003 [17]).

1.4 Obstrucción de las vías aéreas

La obstrucción del flujo de aire durante el asma es generalmente reversible de manera espontánea o con tratamiento [6,21,35,36], y es provocada por la combinación de la contracción del músculo liso, el edema, la hipersecreción de moco y por cambios estructurales de las VA [7,28].

1.4.1 Músculo liso

El músculo liso de las VA es sensible a la acción de neurotransmisores, mediadores proinflamatorios y sustancias exógenas por lo que su contracción, proliferación e hipertrofia es la principal causa de obstrucción en el asma [13,37,38]. Además, el músculo liso también es fuente de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y contribuye con la síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) [5,37].

1.4.2 Edema

El edema es la extravasación de líquidos de los vasos hacia las VA lo que contribuye con su obstrucción [7,21]. En el asma, el edema es consecuencia de la liberación de mediadores

durante la inflamación crónica que producen el incremento de la vascularidad y la vasodilatación [8,17,36,39].

1.4.3 Moco

Las glándulas productoras de moco están distribuidas a lo largo de las VA. En epitelios se conocen como células caliciformes. En pacientes con asma se ha visto oclusión de los bronquios y bronquiolos por tapones mucosos densos y adherentes debido al incremento en la hipersecreción de moco por las glándulas de moco subepiteliales y células caliciformes [15,21,35,39]. Se ha sugerido que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) participa en la hipersecreción de moco al incrementar la proliferación de células caliciformes [40]. Algunos mediadores pro-inflamatorios como la histamina, leucotrienos y algunas proteasas pueden inducir la producción de moco en estas células [6]. Adicionalmente, IL -13 e IL-9 se han asociado con la hiperplasia de las glándulas de moco [9].

Las alteraciones morfológicas de las VA debido a la hipertrofia e hiperplasia de las estructuras que la conforman, reducen de manera permanente su calibre y favorecen la hiperreactividad de las VA. El grado de engrosamiento de la pared de las VA esta asociado con la severidad y persistencia de la enfermedad [5,41,42].

1.5 Cambios estructurales de las vías aéreas

En general la obstrucción de las VA es reversible espontáneamente o con tratamiento, pero en algunos individuos con asma persistente se ha detectado una limitación residual y permanente a este flujo [41]. La obstrucción residual al flujo de aire ha sido atribuida al engrosamiento de las paredes de las VA, generada por la hipertrofia e hiperplasia de múltiples estructuras que la conforman [42]. A este conjunto de cambios se le llama remodelación de las VA. Estos cambios incluyen fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso [8,10,23,39,43], cambios en la cantidad y composición de la MEC y engrosamiento de la MB, la adventicia y el músculo liso [8,10,39,42]. En su conjunto, estas alteraciones modifican a las VA engrosando sus paredes y reduciendo su calibre [7,23,37,44].

Funcionalmente, el grado de engrosamiento de las paredes de las VA se ha asociado con la severidad y persistencia de la enfermedad, así como con el desarrollo de hiperreactividad [5,36,41,42]. Por ejemplo, estudios en animales han confirmado que la prolongada exposición a alergenos puede incrementar el grosor del músculo liso [8] y por consiguiente su facilidad para contraerse tras un estímulo broncoconstrictor [5,13,16]. No obstante, el papel funcional de la remodelación de las VA aún es motivo de controversia [39].

Se ha propuesto que la inflamación persistente tiene un papel importante en el proceso de remodelación de las VA. De manera normal las células inflamatorias inician una respuesta de reparación para restaurar la integridad del tejido, pero la persistencia de la inflamación no permite la regulación adecuada de la reparación, llegando entonces a la remodelación [10,21,36,42]. Varios tipos de células inflamatorias han sido relacionadas con la remodelación de las VA. Por ejemplo, la degranulación de las células cebadas estimula la proliferación del

músculo liso y la producción de colágena por los miofibroblastos [8,21,39]. Por otro lado, los eosinófilos participan en el evento de remodelación al liberar factores de crecimiento, como el TGF- β , además de elastasas y metaloproteasas (MMP) que degradan matriz [7,9,21,36]. En particular, el TGF- β es importante para los procesos de fibrosis debido a que estimula la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, un tipo celular con gran capacidad de secretar colágena [7,8,10]. Por su parte los macrófagos están involucrados en la remodelación a través de la secreción de factores de crecimiento, citocinas y MMP [21,36], mientras que los neutrófilos contribuyen al proceso al ser una fuente importante de colagenasas, hidrolasas ácidas, elastasas, leucotrienos y citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón alfa (IFN- α) e IL-8) [7,9,28].

La fibrosis por acumulación de componentes de la MEC como la colágena tipo I, III y V, fibronectina y tenasina contribuyen con el engrosamiento de la pared de las VA [7,8,11,23,28,35] y potencialmente podrían agravar los síntomas clínicos al afectar su calibre [5,23,44]. La interacción entre componentes de la MEC y células ocurre principalmente a través de receptores celulares conocidos como integrinas [37].

1.6 Integrinas

Las integrinas son una familia de receptores heterodiméricos transmembranales formados por la asociación no covalente de una subunidad α y una β . El dominio extracelular de las integrinas reconoce como ligandos a componentes de la MEC [45-49], a moléculas de superficie celular y a algunos ligandos solubles [50], mientras que el dominio citoplasmático esta asociado con el citoesqueleto [47,48,51]. En humanos se conocen 18 subunidades α y 8 β , y su combinación genera 24 receptores heterodiméricos de integrina [37,50,52].

Las integrinas están involucradas en diversas funciones. Por ejemplo, el reclutamiento de células de sangre periférica hacia las VA está mediado por integrinas y es el resultado de interacciones adhesivas entre células inflamatorias circundantes y células endoteliales vasculares, así como con componentes de MEC [7,10,46]. La unión de integrinas con sus ligandos desencadena una secuencia de señales intracelulares que inducen o inhiben la expresión de genes que codifican citocinas [12,45], MMP [37,39], inhibidores del ciclo celular y moduladores de apoptosis, diferenciación y proliferación celular [46,48].

1.6.1 Subunidad beta-1 de integrina

La subunidad beta-1 (β_1) tiene la peculiaridad de asociarse con al menos 12 (de α_1 a α_{11} y α_v) de las 18 subunidades de integrinas alfa (α) conocidas [51]. Funcionalmente la subunidad β_1 de integrina (CD29) tiene un papel muy importante en procesos de adhesión, migración, proliferación, secreción y diferenciación en muchas células. En las VA la subunidad β_1 es expresada en músculo liso, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T [45,53-55].

La activación de la subunidad β_1 en el músculo liso de las VA por colágena monomérica tipo I y fibronectina regula la capacidad de diferenciación, secreción y proliferación

del músculo [12,53,56] Adicionalmente, la cinasa asociada a integrinas que se encuentra en el dominio citoplásmico de la subunidad β_1 , puede activar y regular la contracción del músculo liso directamente por fosforilación de miosina e indirectamente por inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina [47,48,57,58].

La subunidad β_1 tienen un papel fundamental durante la inflamación de las VA. Se ha reportado que la subunidad β_1 de integrina, asociada con la subunidad α_4 expresada sobre neutrófilos, basófilos y linfocitos T, interactúa con fibronectina y origina que estas células se adhieran al endotelio para su posterior migración hacia los sitios de inflamación [9,10,45]. Adicionalmente ésta misma integrina puede unirse con moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) [45,53] que se expresan sobre epitelio inflamado, células dendríticas y macrófagos [45,50]. La unión de β_1 de los linfocitos T con su ligando, junto con el complejo receptor de células T (TCR)-CD3, inducen proliferación y producción de citocinas [45]. Por otro lado, β_1 asociada a α_3 es crítica en la morfogénesis y en la organización estructural de la MB [36]. Finalmente, se ha visto que el tratamiento con anticuerpos contra ciertas integrinas β_1 bloquea la hiperreactividad de las VA en un modelo de asma alérgica [55].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es una de las enfermedades crónicas tratables más comunes a nivel mundial que está incrementando su prevalencia y junto con su naturaleza crónica representa una significativa carga económica [6,14]. La prevalencia de la enfermedad en México es del 2.5 al 5% y se estima que suceden 14.5 muertes por cada 100 000 asmáticos [6]. Esto sugiere que en México esta enfermedad no se trata oportunamente, lo que puede predisponer a su persistencia o severidad [59].

Los cambios estructurales que ocurren en las VA durante el asma son consecuencia de una respuesta inflamatoria crónica. Estos cambios estructurales dan lugar a obstrucción intermitente y reversible, y son importantes en la patogénesis del asma ya que derivan en cambios funcionales asociados con los síntomas propios de la enfermedad. Por lo que es importante comprender la relación entre la remodelación y la pérdida de funcionalidad de las VA ya que aún es controversial.

En este sentido, los modelos de asma en animales son fundamentales para proporcionar información acerca de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, especialmente en la evolución de los cambios estructurales de las VA y su posible relación con la alteración de la función pulmonar. El cobayo en particular es un excelente modelo para estudiar la función pulmonar debido a la gran cantidad de músculo liso que posee y es muy susceptible a generar respuestas inducidas por alérgenos, además de que la broncoobstrucción producida es muy evidente y similar al del humano haciendo de este un excelente modelo con el cual evaluar la hiperreactividad bronquial [60].

3. HIPOTESIS

Si la reducción del calibre de las vías aéreas y el incremento en el espesor de la pared bronquial aumentan la contractilidad muscular, entonces una vez instalado el proceso de remodelación habrá una disminución de la función pulmonar llevando a la persistencia de la enfermedad. Por otro lado, si el engrosamiento de las VA se produce por fibrosis, es probable que la expresión de integrinas esté modificada.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la remodelación subepitelial en la reactividad de las vías aéreas y la respuesta de broncoobstrucción inducida por el alérgeno en cobayos sensibilizados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Demostrar que la administración repetitiva de retos con ovoalbúmina en cobayos sensibilizados induce remodelación de las estructuras subepiteliales de las vías aéreas.
2. Determinar si la magnitud de la respuesta al reto antigénico, el tono basal y la reactividad de las vías aéreas a la histamina se relacionan con los diferentes niveles de remodelación de las estructuras subepiteliales del cobayo.
3. Especificar el tipo celular de las vías aéreas que expresa la subunidad β_1 de integrina y relacionar su grado de expresión con la remodelación, la magnitud de la respuesta inmediata al reto antigénico y la reactividad de las vías aéreas a la histamina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron cobayos machos de la raza Hartley con pesos aproximados de 350 a 450 g que se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER): 12/12 h de ciclo luz y oscuridad, aire filtrado, temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50 al 70 % de humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan México, S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético y Científico del INER (B-1806).

5.2 Procedimiento de sensibilización

5.2.1 Día 1

Los cobayos fueron sensibilizados a la ovoalbúmina mediante dosis únicas de una mezcla de ovoalbúmina (OVA) (0.06 mg/mL, Sigma St Louis, EU) con hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) como adyuvante (1 mg/mL; J.T. Baker, NJ, EU) disuelto en 1 mL de solución salina fisiológica (SSF). La mezcla se dividió en dos dosis de 0.5 mL, una se administró por vía intraperitoneal (i.p.) y la otra por subdérmica (modificado de Campos y col., 2001) [61].

5.3 Pletismografía

5.3.1 Día 8: Refuerzo antigénico

Ocho días después de la sensibilización se reforzó el reto antigénico nebulizando OVA (3 mg/mL SSF) durante 5 min utilizando un nebulizador US-Bennet (flujo de 2 mL/min). Este nebulizador libera una mezcla de partículas 44% menor a $4 \mu\text{m}$ de diámetro, 38% de 4 a $10 \mu\text{m}$ y 18% mayor a $10 \mu\text{m}$. Cinco minutos antes y una hora después del reforzamiento antigénico, se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) (Fig. 6).

Brevemente, las determinaciones de las funciones pulmonares mediante pletismografía barométrica consistieron en mediciones directas de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara que se comparan con una cámara de referencia [62,63] (Fig. 6). Dichas fluctuaciones 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 un programa (Buxco Biosystem XA v1.1) instalado en una computadora. Los resultados se almacenaron utilizando un programa especial para el manejo automatizado de los datos (Buxco BioSystem XA, versión 0.9.3, NY, EU). Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 mL o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15s, tiempo inspiratorio de 3s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de evitar incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al

10% de las respiraciones de cada período fueron eliminadas y estas se generaron principalmente por movimientos del cobayo. El pletismógrafo barométrico cuantifica, entre otras cosas, el índice de broncoconstricción (íB), que refleja el grado de obstrucción de las VA [64,65]. Este índice se basa teóricamente en lo siguiente: durante la inspiración, el aire que ingresa al tórax del cobayo aumenta su temperatura (de ~25 °C a 37 °C) y humedad (al 100%) provocando su expansión por aumento en el volumen. Este fenómeno incrementa la presión de la cámara durante la inspiración. Sin embargo, cuando el aire del tórax es eliminado, este disminuye su expansión debido a que su temperatura y humedad bajan, disminuyendo la presión en la cámara [66,67]. Esta información es procesada por un programa computacional que proporciona el valor del íB y es obtenido con la siguiente fórmula [64] :

$$\text{íB} = \left[\frac{(\text{Te} - \text{Tr})}{\text{Tr}} \right] \left[\frac{\text{PFE}}{\text{PFI}} \right] \quad \text{donde:}$$

Te = Tiempo total espiratorio (s)

Tr = Tiempo total de relajación (s)

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

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

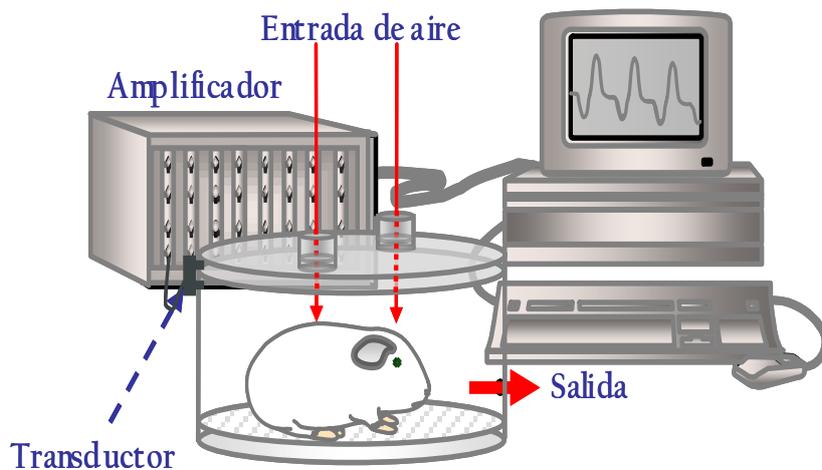


Figura 6. Dibujo del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registra dichos cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

5.3.2 Día 15: Primer reto

Ocho días después del reforzamiento antigénico, los cobayos sensibilizados fueron retados con OVA (1mg/mL SSF) durante un minuto siguiendo el protocolo de pletismografía del día de refuerzo antigénico (Día 8).

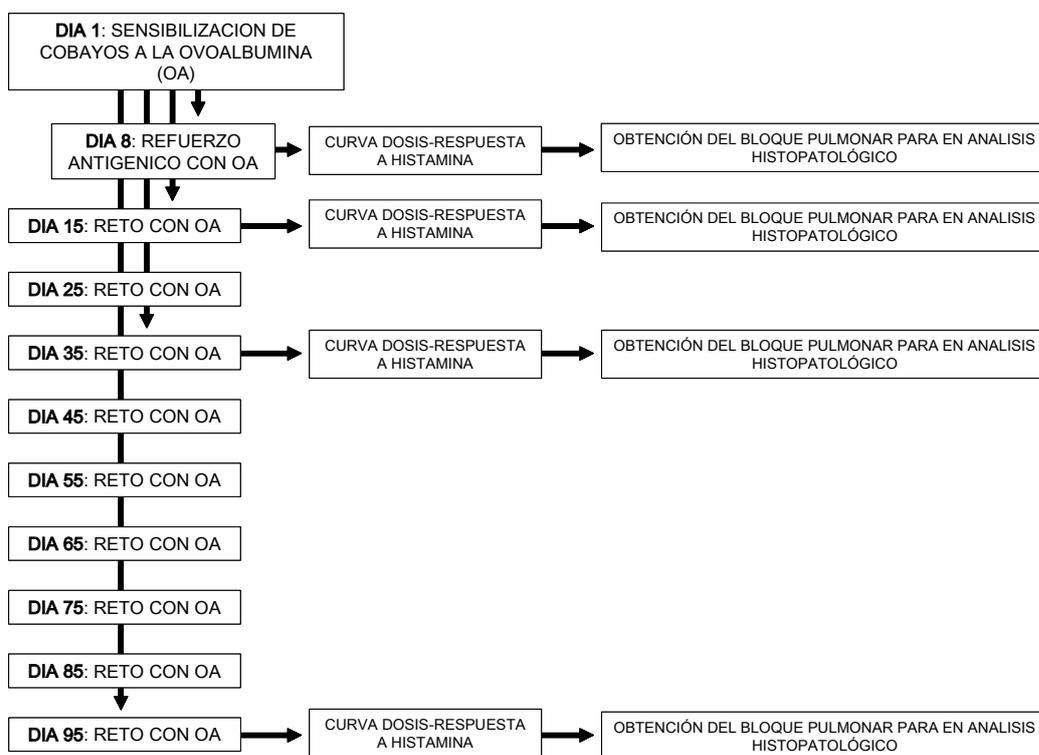
5.3.3 Retos subsecuentes

Después del primer reto, los subsecuentes retos a la OVA se administraron cada diez días en dosis de 0.5 mg/mL SSF hasta completar nueve retos.

5.4 Reactividad de las vías aéreas

La reactividad de las VA fue evaluada en los grupos controles y en los diferentes grupos experimentales el día del refuerzo antigénico (día 8) y en la primera, tercera y novena nebulización con OVA (días 15, 35 y 95, respectivamente), comparando las curvas dosis-respuesta a la histamina antes y después de la administración de OVA (Fig. 7A). Para ello, inicialmente se adquirió el íB basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (de 0.013 a 0.32 mg/mL; Sigma St Louis, EU) durante 1 min. Para cada dosis se registró el íB durante 5 min y se obtuvo el valor promedio. El intervalo entre la administración de cada dosis fue de 10 min. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una broncoobstrucción que duplicó el valor basal del íB (Dosis provocativa 200 ó PD₂₀₀). Posteriormente se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un íB aproximado al 50% del valor basal [62], y se reto con aerosoles de OVA (0.5 mg/mL SSF, 1 min). La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva [68]. También se evaluó la reactividad a la histamina en dos grupos adicionales de cobayos sensibilizados con OVA que solo recibieron una o nueve nebulizaciones con el vehículo (SSF), para evaluar las funciones pulmonares y los cambios morfológicos de las VA de acuerdo a la edad del cobayo (Fig. 7B).

A) Grupos experimentales:



B) Grupos controles:

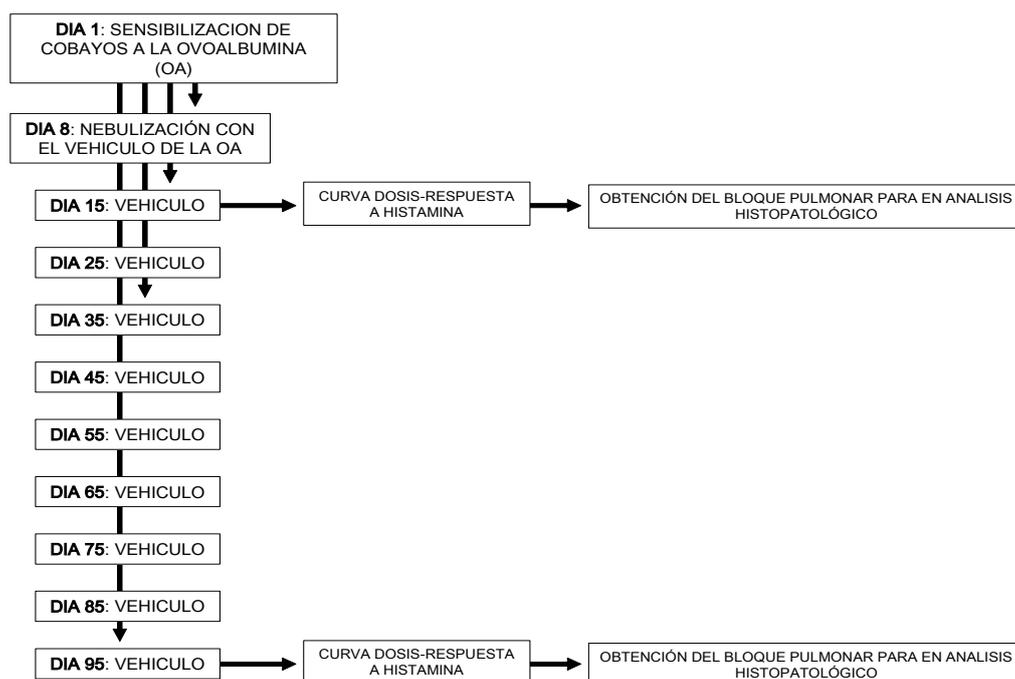


Figura 7. Plan de sensibilización.

5.5 Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar

Después de la segunda curva a histamina y una vez que el iB regresara al $\sim 50\%$ del valor basal [62], los cobayos fueron sobredosificados con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (28 mg/kg) para producir paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se realizó una traqueotomía para introducir una cánula endotraqueal por donde se administraron, utilizando una jeringa, 5 mL de SSF estéril a $37^{\circ}C$ que fue recuperado lentamente 1 min después. Este procedimiento se repitió y el fluido obtenido se mezcló con el primero. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm ($4^{\circ}C$) en una centrífuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania) y el sedimento celular se resuspendió en 1 mL de SSF. Para establecer el número total de células en el LBA, se tomaron 10 μL de la suspensión celular y se colocaron en 40 μL de azul de tripan al 0.4% (Sigma Aldrich Company). 10 μL de esta mezcla se depositaron en una cámara de Neubauer donde se realizó el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y después por el factor de la cámara (10,000) expresado como el número de células por mililitro de LBA. Posteriormente, el volumen celular se ajustó hasta tener 1×10^6 células/mL, adicionando SSF, y 50 μL se colocaron en una citrocentrífuga (7120 Aerospray Wescor Cytospin, EU) para realizar un frotis celular que fue teñido con la técnica Romanowsky para conteo diferencial. Esta tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology reagent ABC, USA) como colorantes principales, para dar las siguientes tonalidades: núcleo en púrpura, eritrocitos en rosa, gránulos de neutrófilos en púrpura y gránulos de eosinófilos en rosa-naranja. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz (Olympus, Japón) a un aumento de 100x.

5.6 Histología convencional y análisis morfométrico automatizado

Una vez que el LBA fue obtenido, se disecó el lóbulo inferior izquierdo del pulmón y se profundió con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences, USA) para posteriormente incluir secciones sagitales del tejido en parafina. Algunas secciones de 4 μm de grosor se tiñeron con hematoxilina-eosina (H/E), rojo Sirio y la técnica tricrómica de Masson en el laboratorio de Patología del INER. Todas las secciones teñidas fueron examinadas y medidas utilizando un microscopio de luz con analizador de imágenes (Leica Microsystems, Cambridge, UK). Las muestras se codificaron y las regiones a medir se eligieron al azar. El área de la mucosa subepitelial y el músculo liso de 6 bronquios y 6 bronquiolos fueron determinadas en micras cuadradas usando morfometría automatizada (Leica Qwin Image Analyzer, Leica Microsystems, Cambridge, UK). Los bronquios y bronquiolos fueron identificados, respectivamente por la presencia o ausencia de cartílago en la pared de las VA. Para determinar hiperplasia se realizó un conteo de núcleos totales de la banda de músculo liso bronquial en las secciones de H/E en un aumento de 200x.

5.7 Detección inmunohistoquímica de la subunidad beta-1 de integrina, α -actina, vimentina y proteína de neurofilamentos en las vías aéreas

Los mismos bloques pulmonares incluidos en parafina, utilizados para el estudio morfométrico, se utilizaron para la detección inmunohistoquímica de la subunidad β_1 de integrina, α -actina (para identificar células musculares), proteína de neurofilamento (para identificar fibras nerviosas) y vimentina (para identificar fibroblastos) en las VA. Para ello, se realizaron secciones de 3 μm de grosor y se colocaron en láminas de vidrio silanizadas (Sigma, St Louis MO, USA). Los cortes se desparafinaron (55°C durante 30 min) y rehidrataron utilizando alcoholes graduados (Xilol, etanol (EtOH) absoluto, EtOH al 90% y EtOH al 70%) y agua destilada. La recuperación antigénica se hizo utilizando una solución amortiguadora de citratos (ácido cítrico 10 mM, pH 6.0) a 70°C por 20 min. En seguida, se bloqueó la peroxidasa endógena preincubando los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% (Merck KGaA Germany) y los sitios no específicos se bloquearon con suero de cerdo al 2% en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) (NaH_2PO_4 13 mM, Na_2HPO_4 88 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2). Las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos contra la subunidad β_1 de integrina (dominio extracelular de CD29, anticuerpo policlonal anti-IgG de humano hecho en conejo; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en una dilución de 1:50, α -actina (anticuerpo monoclonal anti-IgG2a de actina de músculo liso humano hecho en ratón; BioGenex, San Ramón CA, USA) en una dilución de 1:50, vimentina (anticuerpo policlonal anti-IgG₁ humana hecho en ratón; BioGenex, San Ramón CA, USA) en una dilución 1:200, y proteína de neurofilamento (anticuerpo monoclonal anti-IgG de humano hecho en ratón; Dako, Cambridgeshire, UK) en una dilución 1:100. La detección de la unión específica del anticuerpo se realizó utilizando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y una solución de complejo preformado de estreptavidina y peroxidasa biotilada (R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame, CA, USA). Para revelar se utilizó una solución de 3-amino-9-

etil-carbazol (AEC; BioGenex, USA) en solución amortiguadora de acetatos (acetato de sodio 0.5 mM; pH 5.0), con 0.05% de H₂O₂ como sustrato. Las laminillas se lavaron dos veces con PBS/Tween 20 (Sigma, St Louis MO, USA) entre todas las incubaciones. Finalmente se contratiñeron los cortes con hematoxilina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Para controlar la unión inespecífica del anticuerpo seccionaron del mismo cobayo se procesaron como se ha descrito, pero sin el anticuerpo primario. El porcentaje de áreas que presentaron inmunotinción para la subunidad β_1 de integrina, se determinaron por medio de un analizador de imágenes automatizado (Q-Win Leica), después se realizó un conteo de áreas positivas y negativas elegidas aleatoriamente en la submucosa y el músculo liso, con un aumento de 200x.

5.8 Microscopía electrónica

Para determinar la localización subcelular de la subunidad β_1 de integrina en el pulmón, se realizó inmunomicroscopía electrónica. Se tomó un milímetro de la pared bronquial de los bloques de parafina de animales del noveno reto y se rehidrataron en alcoholes graduados, posteriormente fueron embebidos en resina hidrosoluble LR-White (Londosn Resin Co., Hampshire, UK). Se examinó en cada bronquio la amplitud de la membrana basal, la submucosa y las bandas de músculo liso utilizando microscopía de luz convencional. Los tejidos elegidos fueron seccionados para reducir el área seleccionada y algunos cortes de 70 a 90 nm de grosor fueron colocados en rejillas de níquel e incubadas toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal específico para la subunidad β_1 de integrina (CD29, anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo hecho en ratón; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido 1:5 en PBS. Después de un intenso lavado en PBS, las rejillas fueron incubadas una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-conejo hecho en cabra conjugado con partículas de oro de 5 nm (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) y diluido 1:20 en PBS. Las rejillas fueron contrastadas con sales de uranio (Electron Microscopy Sciences. Fort Washington, PA, USA) y examinadas con un microscopio electrónico M-10 Zeiss electron microscope (Karl Zeiss, Jena, Germany). Como controles negativos, los anticuerpos primarios fueron sustituidos por suero normal de conejo.

5.9 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba pareada de t de Student para evaluar los cambios en la respuesta inducida por histamina, comparada con sus respectivos valores basales. La comparación de la estructura de las VA entre los grupos antes y después del reto con OVA se evaluó por la prueba no-pareada de t de Student. En comparaciones múltiples se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía o mediciones repetidas, seguida de las pruebas de Tukey o Dunnet según correspondiera. Los resultados se presentaron como las medias \pm error estándar. Los datos se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Obstrucción de las vías aéreas inducida por ovoalbúmina en cobayos sensibilizados

Desde el primer reto (Día 15) la nebulización con OVA produjo un incremento transitorio del \dot{V}_B en los cobayos sensibilizados (Fig. 8A). El valor máximo del \dot{V}_B alcanzado en el primer reto con OVA fue similar al alcanzado en los retos subsecuentes (Fig. 8B). La nebulización con SSF en los cobayos control y con OVA durante el reforzamiento antigénico, no produjo modificaciones del \dot{V}_B .

El valor basal del \dot{V}_B , que fue obtenido antes de la administración de cualquier fármaco, fue similar a lo largo del estudio en los cobayos control (Fig. 9). En los cobayos retados con OVA se produjo un incremento progresivo del \dot{V}_B basal que alcanzó significancia estadística en el noveno reto (Día 95), en comparación con el primero (Día 15) ($n = 5$; $P < 0.05$).

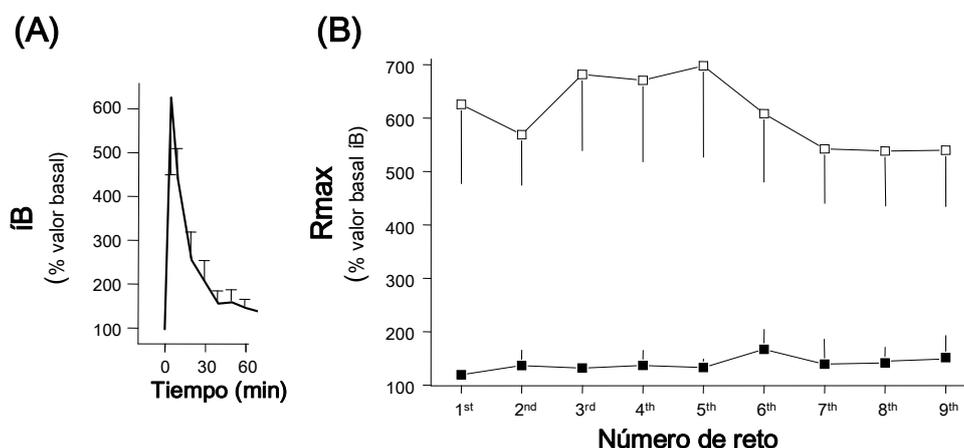


Figura 8. La ovoalbúmina induce broncoobstrucción transitoria en un modelo de asma alérgica crónica y aguda en cobayos. (A) Curso temporal de la respuesta a la OVA durante el primer reto con el alérgeno en cobayos sensibilizados. (B) Respuesta broncoobstructiva máxima en cobayos retados con OVA (cuadros blancos) y con solución salina (cuadros negros). Los símbolos representan las medias \pm E.E.; $n = 5$ animales en cada grupo. \dot{V}_B = índice de broncoobstrucción, Rmax = respuesta máxima, OVA= ovoalbúmina.

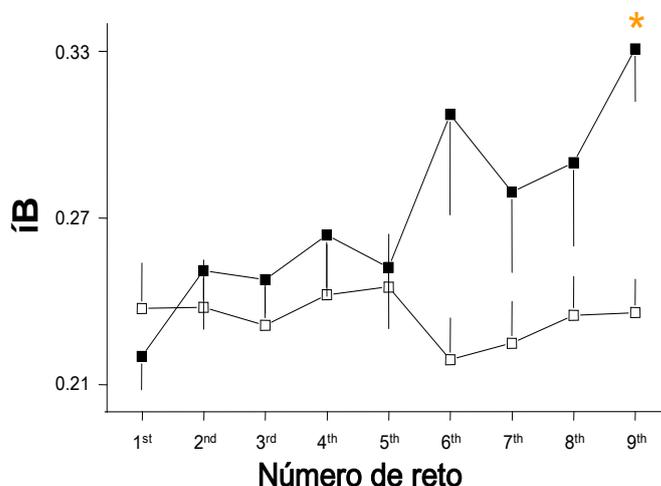


Figura 9. Incremento progresivo del índice de broncoobstrucción (\dot{V}_B) basal en cobayos con asma alérgica crónica. Los valores del \dot{V}_B en cobayos retados con solución salina (cuadros blancos) y con OVA (cuadros negros), fueron obtenidos al principio de cada registro pletoisométrico y antes de la administración de fármacos. * $P < 0.05$ comparada con su respectivo valor del primer reto (ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett)

6.2 Reactividad de las vías aéreas

El grado de hiperreactividad bronquial en los animales fue medido por el incremento en la sensibilidad a histamina inhalada. La dosis provocativa basal 200 (DP₂₀₀) de aerosoles de histamina, es decir, aquella dosis que hizo duplicar el valor basal, no fue diferente de la DP₂₀₀ obtenida después del reto con OVA en los controles y en el grupo del refuerzo antigénico (Día 8) (Fig. 10). Después del primer, tercer y noveno retos (Días 15, 35 y 95, respectivamente) los cobayos mostraron una disminución significativa de la DP₂₀₀ en comparación con el valor basal ($n = 6$ en el primero y $n = 5$ en el tercer y noveno retos; $P < 0.05$). La diferencia entre los valores de DP₂₀₀ de histamina antes y después del primer, tercer y noveno retos con OVA, no fue diferente (0.0082 ± 0.0046 , 0.0183 ± 0.0139 , 0.0142 ± 0.0113 mg/mL de histamina, respectivamente).

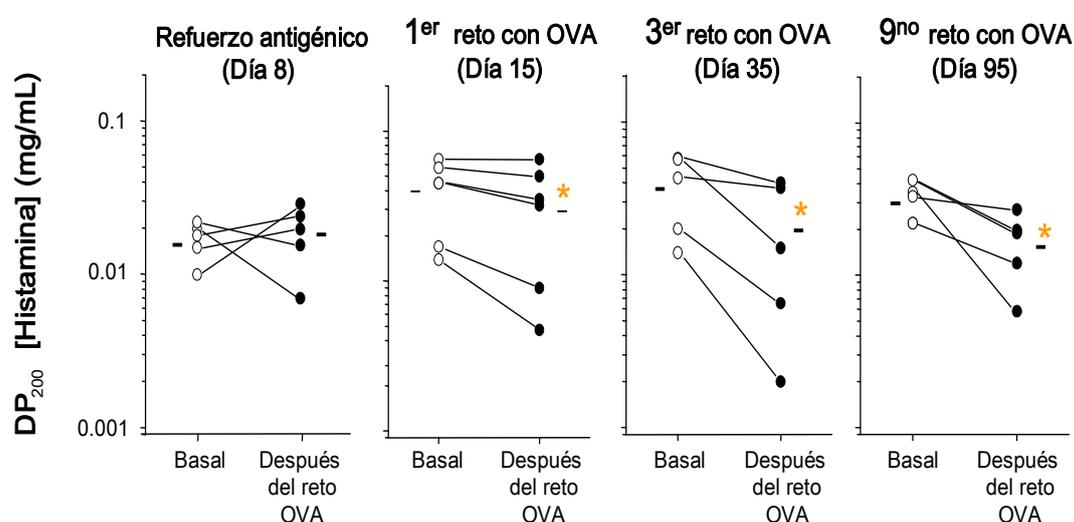


Figura 10. Reactividad de la vía aérea a la histamina en cobayos con asma alérgica aguda y crónica. Los puntos en la gráfica muestran las dosis de histamina requeridas para producir el 200% de incremento del íB basal (DP₂₀₀). Las líneas en el centro de cada gráfica unen los datos de cada cobayo. Los valores promedio basales entre la curva dosis-respuesta a histamina (círculos blancos), y la curva realizada tres horas después del reto con OVA (círculos negros), aparecen como líneas horizontales. * $P < 0.05$ comparado con su respectivo valor basal (prueba pareada de t de Student). OVA = ovoalbúmina.

6.3 Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar

En los cobayos control, de día 15 y 95, el conteo celular total y diferencial fue similar. En la Fig.11 se muestra que el conteo celular total y el número de macrófagos no fueron significativamente diferentes entre los grupos. Los neutrófilos se incrementaron progresivamente alcanzando significancia estadística desde el tercer reto con OVA (Día 35), en comparación con el grupo control y el grupo del refuerzo antigénico (Día 8) ($P < 0.05$; $n = 5$ y $n = 10$, respectivamente)

Por otro lado, en la misma figura se muestra que el conteo de eosinófilos se incrementó desde el día del refuerzo antigénico en comparación con el grupo control ($P < 0.05$; $n = 5$ y $n = 10$, respectivamente), y este incremento se mantuvo en los subsecuentes retos.

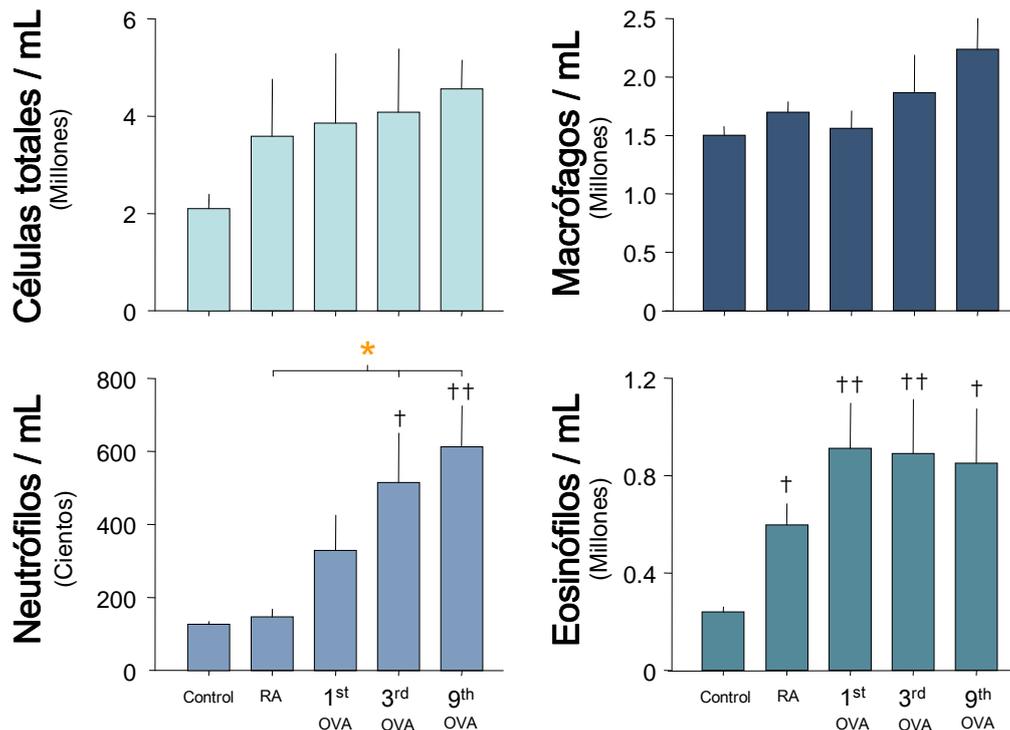
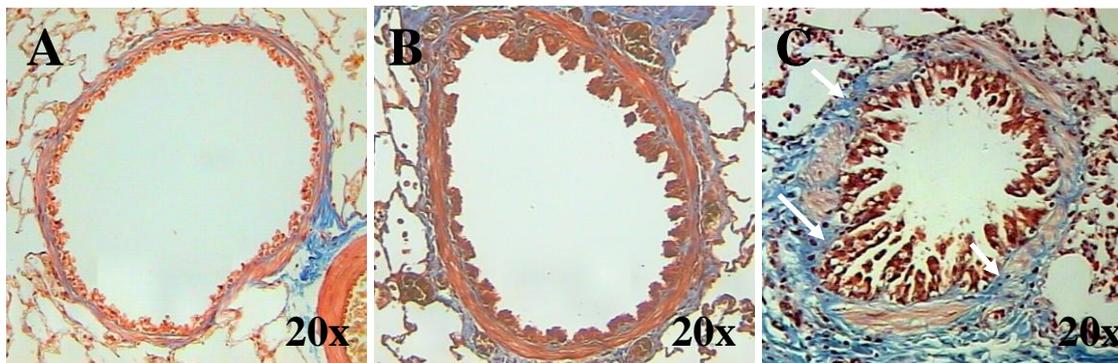


Figura 11. Conteo celular total y diferencial en un modelo de asma alérgica aguda y crónica en cobayos. Las barras representan el promedio \pm E.E. de 5 cobayos por grupo. $\dagger P < 0.05$ y $\dagger\dagger P = 0.01$, comparando con el grupo control (prueba no-pareada de t de Student). $*P < 0.05$ comparado con el grupo de refuerzo antigénico (ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias con la prueba de Dunnett). RA = grupo refuerzo antigénico. OVA = reto con ovoalbúmina.

6.4 Efecto de la estimulación crónica con el alérgeno en la estructura de las vías aéreas

6.4.1. Análisis de la tinción histológica de estructuras subepiteliales

En la Fig. 12 se muestra la acumulación de colágena en estructuras subepiteliales de las VA, identificadas mediante la tinción tricrómica de Masson y la de rojo Sirio como bandas continuas azul y roja, respectivamente (Fig. 12 A a C). Mediante la tinción tricrómica de Masson se logró hacer una clara distinción de las capas de músculo liso por la fuerte coloración roja del citoplasma. La mucosa subepitelial tenía pocas células y estaba compuesta principalmente por tejido fibroso (Fig. 12 D a G).



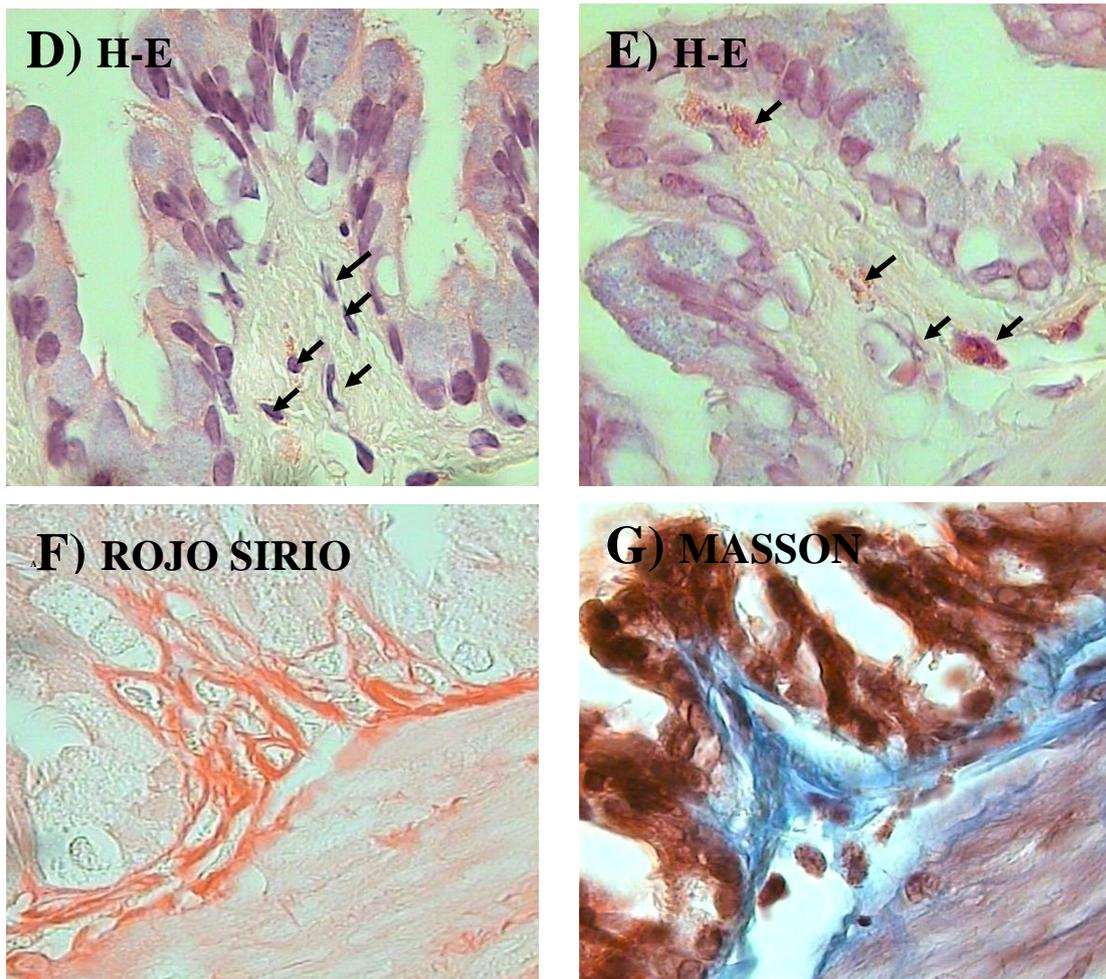


Figura 12. Características histológicas representativas de la mucosa subepitelial de las vías aéreas en cobayos con asma alérgica. Vista panorámica representativa de las vías aéreas de cobayos de (A) grupo control, (B) tercer y (C) noveno grupo retados con OVA (aumento 20x). Las flechas blancas indican áreas con fibrosis alrededor del músculo liso de cobayos con asma crónica (C). La distribución celular en la mucosa subepitelial de cobayos con asma crónica está indicada por flechas negras en el grupo control (D), y los grupos de cobayos del tercer (E) y noveno (F) reto con OVA (Aumento 200x). Distribución de la colágena en la mucosa subepitelial del cobayo del noveno reto (rojo Sirio, banda roja, Panel F y tinción tricrómica de Masson, banda azul, Panel G).

6.4.2 Estructura de la mucosa subepitelial y músculo liso por análisis morfométrico automatizado

El análisis morfométrico automatizado mostró áreas similares de la mucosa subepitelial y músculo liso en los controles y en los grupos del refuerzo antigénico (Fig. 13). Un incremento progresivo del área de la mucosa subepitelial se observó en los bronquiolos desde el tercer reto con OVA (Día 35) en comparación con el grupo del refuerzo antigénico (Fig. 13 A) ($P < 0.05$, $n = 5$).

La capa de músculo liso en los bronquiolos fue significativamente más gruesa en el grupo de nueve retos en comparación con su respectivo grupo control, el grupo de igual edad ($P = 0.05$; $n = 5$) (Fig. 13 B). Como un indicador de hiperplasia, el número total de núcleos en el músculo liso de los bronquiolos de animales alérgicos crónicos (noveno reto) y su respectivo grupo control de igual edad, fue similar (28 ± 2.6 y 30 ± 2.8 núcleos respectivamente; $n = 5$ o $n = 6$ por grupo). Los bronquios no mostraron modificación en la mucosa subepitelial o en el músculo liso.

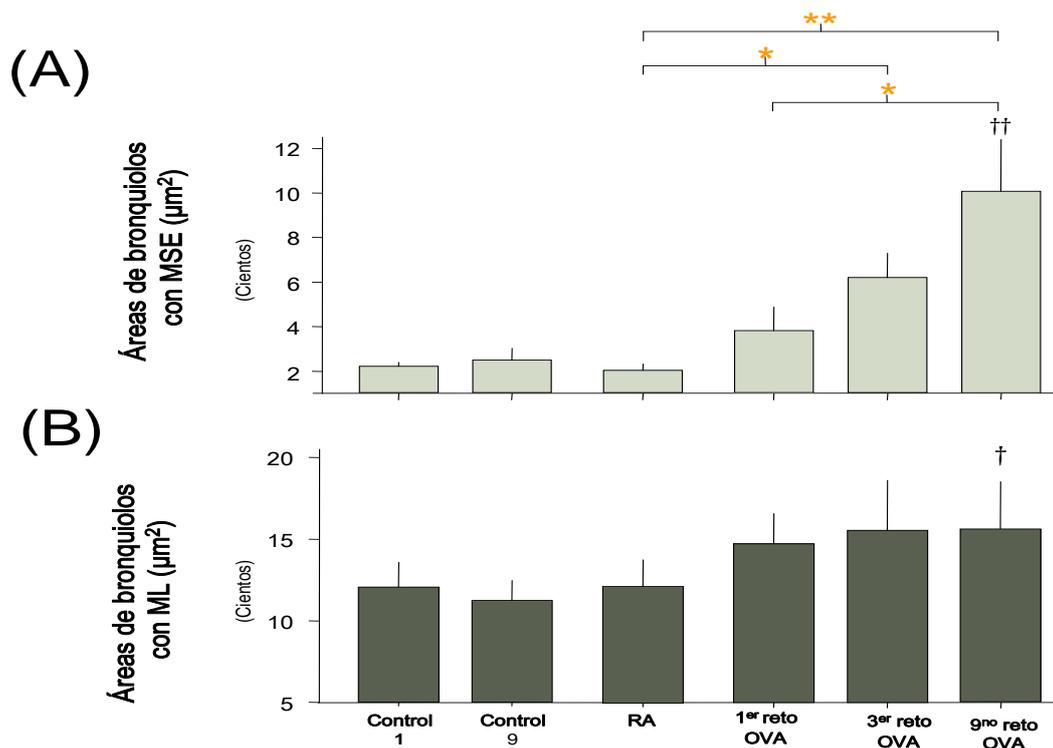
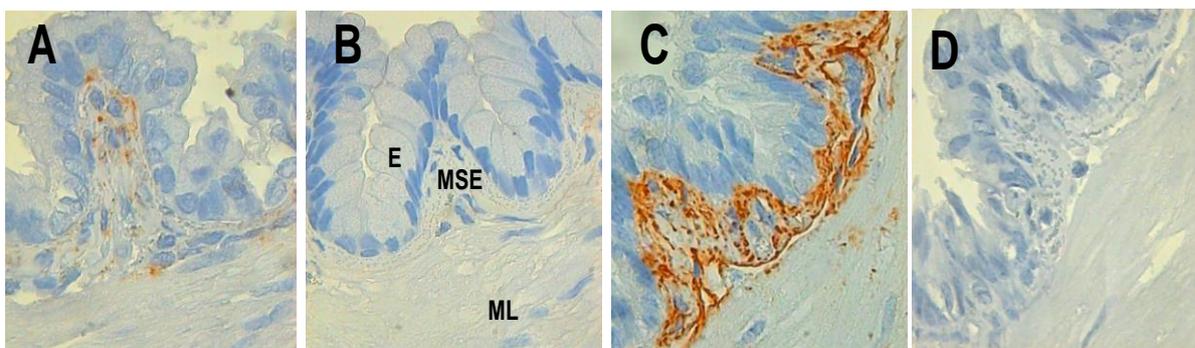


Figura 13. Cuantificación de áreas de mucosa subepitelial y capas de músculo liso de las vías aéreas por morfometría automatizada en cobayos con asma alérgica. (A) Incremento significativo de las áreas de la mucosa subepitelial en relación con el número de retos con OVA. (B) La capa de músculo liso de cobayos alérgicos no mantiene una clara relación con el número de retos. Las barras y las líneas verticales son la media \pm E.E. de 5 animales por grupo. † $P < 0.05$ y †† $P < 0.01$ comparado con su respectivo control de edad (prueba no-pareada de t de Student). ANOVA * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ comparaciones múltiples entre el refuerzo antigénico y los grupos retados con OVA (Análisis de varianza de una vía y comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey). Control 1 y Control 9, corresponden a los grupos controles de edad. OVA = ovoalbúmina. ML= músculo liso. MSE= mucosa subepitelial.

6.4.3 Expresión de la subunidad beta-1 de integrina

La expresión constitutiva de la subunidad β_1 de integrina se observó en vasos sanguíneos, adventicia, lámina propia, membrana basal, y de manera escasa en epitelios y alvéolos. La expresión de la subunidad β_1 de integrina en los grupos controles, refuerzo antigénico, y hasta el tercer reto con OVA fue similar (Fig. 14 A-B, D). En cobayos retados nueve veces se observó una sobreexpresión de β_1 en músculo liso y mucosa subepitelial (Fig. 14 C). En la mucosa subepitelial se observaron pocas células positivas a vimentina (Fig. 14 E), y de escasa a nula expresión de α -actina (Fig. 14 F) y proteína de neurofilamento (Fig. 14 G).



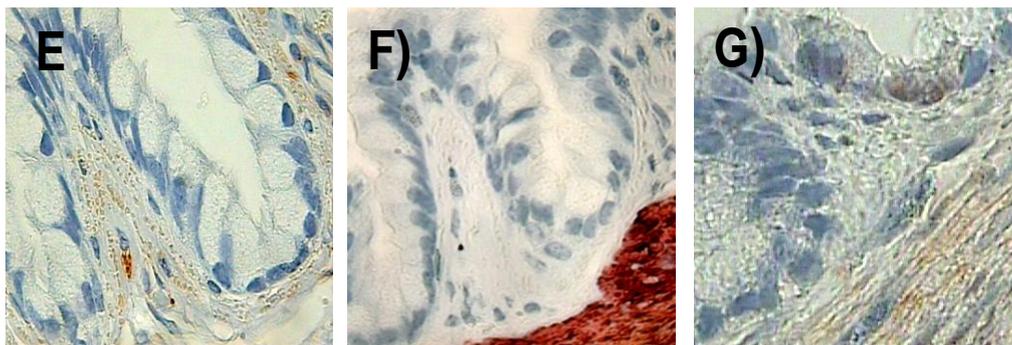


Figura 14. Expresión de la subunidad β_1 de integrina en la vía aérea de cobayos alérgicos mediante análisis de inmunohistoquímica. La expresión de la subunidad β_1 de integrina en la mucosa subepitelial en cobayos sensibilizados del tercer reto con OVA (A) y en los controles fue muy escasa (SSF) (B) en comparación a los cobayos que recibieron nueve retos con OVA (C). No se observó tinción positiva en el control para la unión específica del anticuerpo (D). En animales alérgicos del noveno reto hay una escasa inmunotinción de vimentina en la mucosa subepitelial (E) y ninguna célula fue positiva para α -actina (F) y proteína de neurofilamentos (G) (Aumento 200x). E = epitelio, MSE = mucosa subepitelial, ML = músculo liso.

Por medio de morfometría automática se cuantificaron las áreas en la mucosa subepitelial y el músculo liso de las vías aéreas y se determinó que la expresión de la subunidad β_1 de integrina en el grupo del noveno reto con OVA (día 95), fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo del tercer reto con OVA (día 25) y el grupo control de la misma edad (Fig. 15) ($n = 5$ en cada grupo; $P < 0.01$).

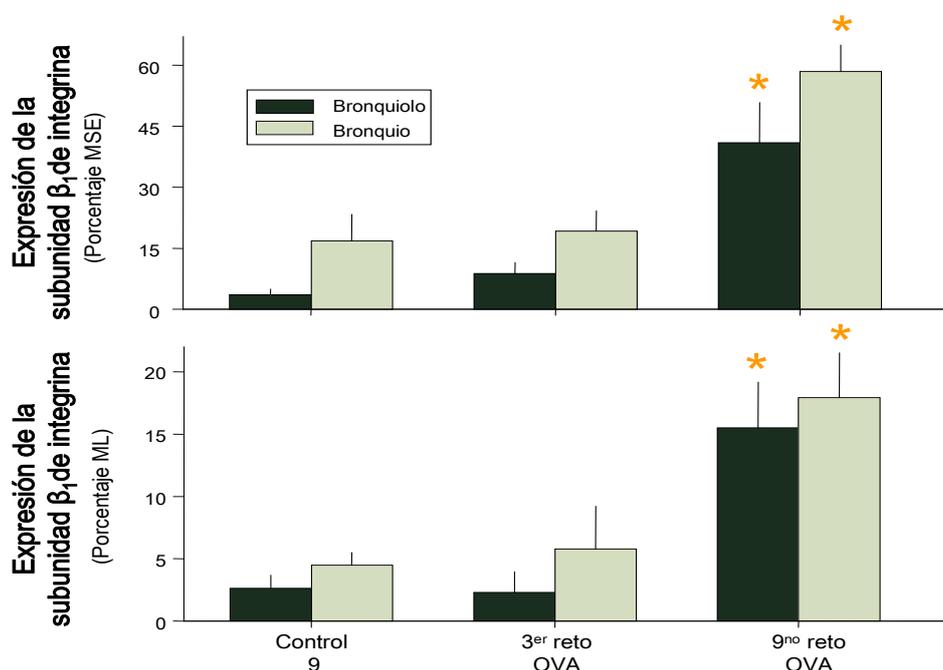


Figura 15. Cuantificación de áreas que expresaron la subunidad β_1 de integrina en la mucosa subepitelial y el músculo liso de la vía aérea de cobayos con asma alérgica, por medio de morfometría automática. Las barras y las líneas verticales muestran la media \pm E.E 5 animales en cada grupo. * $P < 0.01$ (Análisis de varianza de una vía y comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey). Control 9 corresponde al grupo control de la misma edad, MSE = mucosa subepitelial, ML = músculo liso de la vía aérea.

Mediante inmunomicroscopía electrónica se determinó la localización subcelular de la subunidad β_1 de integrina en el pulmón. Las áreas acelulares subepiteliales, incluyendo la membrana basal y la lámina propia, mostraron a la subunidad β_1 asociada a fibras de colágena tipo I y II (Fig. 16).

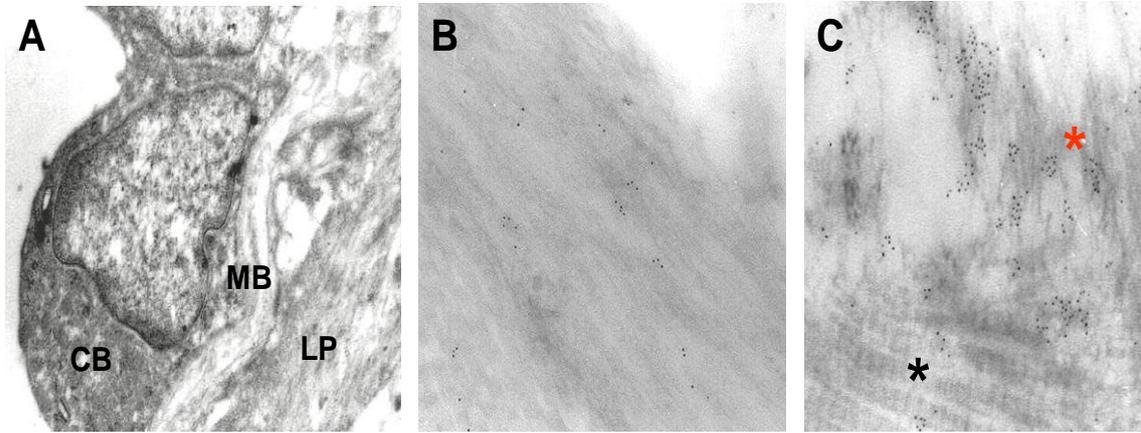


Figura 16. Micrografías representativas de la localización de la subunidad β_1 de integrina, determinada por microscopia inmunoeléctronica en el pulmón de cobayos asmáticos después del noveno reto con OVA. (A) micrografía de bajo poder mostrando células bronquiales no ciliares (CB) suspendidas en la membrana basal (MB) y en fibras de la lámina propia (LP) (Aumento 8 000x). (B) La MB muestra ligeras zonas inmunoreactivas para β_1 (Aumento 55 000x). (C) El tejido conectivo de la submucosa muestra una intensa marca para β_1 en colágena tipo I (*) y tipo II (*) (Aumento 55 000x).

7. DISCUSIÓN

En este modelo, los síntomas de asma como hiperreactividad y broncoobstrucción de las vías aéreas aparecen de manera simultánea después del primer reto con el alérgeno, y este proceso fue independiente del desarrollo de inflamación y remodelación de las vías aéreas.

Una de las características más consistentes y fundamentales del asma es la hiperreactividad de las vías aéreas a varios estímulos. El mecanismo a través del cual se induce la hiperreactividad de las vías aéreas aún es desconocido, no obstante, la inflamación [69] y la remodelación de las vías aéreas se han relacionado con el desarrollo de la hiperreactividad [5,11]. Los cambios inflamatorios han sido descritos como una acumulación de eosinófilos, linfocitos y células cebadas en la pared bronquial. La respuesta inflamatoria después de una exacerbación asmática es caracterizada por el infiltrado transitorio de neutrófilos, seguido más tarde por el de eosinófilos [27,70,71]. En este estudio, la neutrofilia se presenta después de varios retos antigénicos; mientras que la eosinofilia se desarrolló antes de que los síntomas (obstrucción bronquial inducida por el reto e hiperreactividad) se manifestaran y, en contraste a la neutrofilia que fue progresando en el asma crónica, la eosinofilia mantuvo el mismo nivel independientemente de la cronicidad del asma. En conclusión, no se observó relación entre los síntomas y el desarrollo de la eosinofilia y neutrofilia en este modelo de asma.

Los neutrófilos y eosinófilos son importantes contribuidores a la remodelación de las vías aéreas en el asma [7,9,42]. Desde que la eosinofilia aparece, es posible que los cambios en la estructura de las vías aéreas se empiecen a desarrollarse. Sin embargo, para producir alteración en la estructura subepitelial fue necesaria la repetición de los retos con el antígeno, indicando que la inflamación crónica podría estar implicada en el proceso de remodelación subepitelial de las vías aéreas.

Los bronquiolos de los cobayos fueron más susceptibles a mostrar cambios anatómicos que los bronquios. Los bronquiolos presentaron dos diferentes patrones de remodelación: uno tardío, el engrosamiento del músculo liso, y uno progresivo, la expansión de la matriz extracelular en la mucosa subepitelial. Un importante contribuidor del engrosamiento de la submucosa fue la expansión de la matriz extracelular. Hay evidencia de que este proceso ocurre tempranamente, pues se ha encontrado remodelación en biopsias de las vías aéreas de niños con síntomas respiratorios no-específicos que subsecuentemente desarrollan asma, además de mostrar infiltrado de eosinófilos [21,39]. Asimismo, se ha relacionado el engrosamiento de la submucosa con la severidad de la enfermedad [11,39,43,72] y se ha sugerido que una de las consecuencias funcionales de la expansión de la mucosa subepitelial es la amplificación de la contracción del músculo liso por una disminución en la distensibilidad de las vías aéreas [5]. Adicionalmente, el engrosamiento del músculo liso puede por sí mismo aumentar la obstrucción de la luz de las vías aéreas por su exacerbada capacidad de contracción [5,42]. En este modelo, observamos que el incremento de la masa de músculo liso

de las vías aéreas no fue influenciado por la edad al comparar el grupo de animales que llegaron al noveno reto, con los animales de la misma edad que no fueron retados con el alérgeno. Se ha reportado que en casos de asma crónica el área del músculo liso de las vías aéreas aumenta de un 50 a 230%, mientras que en casos de asma aguda el incremento es del 25 al 150% [39,43]. Estudios en animales han confirmado que una prolongada exposición al alérgeno puede incrementar el área del músculo liso [8]. No obstante, en este modelo de asma la respuesta alérgica y la magnitud de la hiperreactividad no cambiaron debido a la fibrosis subepitelial ni al engrosamiento de la pared de las vías aéreas. En contraste, se observan numerosas capas de músculo liso en animales alérgicos sin una clara relación con el número de retos.

En este modelo, la persistencia de asma alérgica se asoció con el incremento progresivo del índice de broncoobstrucción basal. En humanos se ha observado que el engrosamiento de la submucosa puede contribuir a la limitación permanente del flujo del aire [10,11,43]. Así, tanto la expansión progresiva de la submucosa como el engrosamiento tardío del músculo liso pudiesen ser factores que contribuyeron al incremento del índice de obstrucción basal de las vías aéreas de los cobayos.

Un fenómeno notable de los cobayos a los que se les indujo asma crónica fue la sobreexpresión de la subunidad β_1 de integrina en estructuras subepiteliales. Se ha observado que las integrinas del músculo liso vascular están involucradas en la regulación del tono miogénico sensible a dihidropiridinas. La unión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con su ligando incrementa sustancialmente la entrada intracelular de calcio que lleva al incremento del tono del músculo liso [73,74], ya que se ha considerado a las integrinas como mecanorreceptores capaces de percibir la rigidez del sustrato vía la contracción periódica del citoesqueleto de actina asociado a ellas [75]. Adicionalmente, la cinasa unida a integrinas, que interacciona directamente con el dominio citoplasmático de la subunidad β_1 de integrina, puede activar y regular la contracción del músculo liso [57,58]. Recientemente se ha observado que es necesario el reclutamiento de integrinas β_1 en la contracción inducida por acetilcolina en el músculo liso de las vías aéreas de perro [76]. Por lo que es posible que, la sobreexpresión de la subunidad β_1 de integrina en el músculo liso pudiese favorecer el incremento del tono del músculo liso de las vías aéreas contribuyendo al incremento del índice de broncoobstrucción basal; sin embargo, algún mecanismo compensatorio puede estar evitando que la contracción de este tejido sea exacerbada.

Un interesante hallazgo de este estudio fue que la sobreexpresión de la subunidad β_1 de integrina se encontró en áreas subepiteliales acelulares. Estructuralmente, la mucosa subepitelial incluye a la membrana basal y a la lamina propia, éste último compartimiento también es llamado submucosa y está constituido por diversos tipos celulares embebidos en un gran y dinámico complejo de matriz extracelular. En esta estructura observamos algunas células como fibroblastos y células inflamatorias. El análisis por inmunomicroscopía electrónica mostró que la subunidad β_1 de integrina estaba asociada a las colágenas tipo I y II. De todos los tipos de integrina se sabe que sólo cinco, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ y $\alpha_{11}\beta_1$, son receptores de

colágena. Los sitios de unión a la colágena de estas integrinas se localizan en el dominio I de la subunidad α de integrina [77]. Por lo que probablemente la subunidad β_1 de integrina, que se observó asociada a la colágena tipo I y II, se encuentra formando un dímero con una subunidad α de integrina y ambas subunidades pueden corresponder a la forma soluble del dominio extracelular unido a la colágena, ya que estos dímeros no están asociados a una célula. Para apoyar esta hipótesis, se ha descrito que la producción experimental de integrinas solubles sin los dominios transmembranales ni citoplasmáticos poseen la capacidad para ensamblarse y formar heterodímeros estables [78-80]. Estas integrinas solubles conservan la capacidad de unirse a componentes de la matriz extracelular y poseen las mismas características de los dominios extracelulares de las integrinas membranales [79,80].

Aunque hasta ahora las integrinas solubles solo se han producido de manera experimental, se han detectado receptores solubles para algunas citocinas en fluidos corporales. Estos receptores solubles pueden ser generados por mecanismos como la escisión proteolítica de los ectodominios del receptor por metaloproteasas activadas durante la inflamación y mediante *splicing* alternativo de transcritos de RNAm [81,82].

Funcionalmente, y en contraste con los receptores membranales, los receptores solubles de citocinas no incrementan la actividad celular ya que no poseen el dominio transmembranal ni citoplásmico; sin embargo, los receptores solubles de citocinas pueden modular respuestas celulares actuando como antagonistas competitivos de los receptores membranales, además, el complejo ligando-receptor soluble puede unirse al receptor membranal, proceso conocido como transeñalización [81-83]. Por otro lado, los receptores solubles de citocinas actúan como un mecanismo regulador endógeno contra la función sistémica de las citocinas y amplifican su función parácrina [84]. En este contexto, es posible que las integrinas solubles compitan con las membranales por sitios de unión a colágena evitando que la célula se una a la matriz (o a otras células) lo que modula los procesos de infiltración celular y la contracción activa del músculo liso.

Las integrinas son importantes moduladores de la síntesis y degradación de colágena, proceso necesario que se lleva a cabo continuamente para reemplazar colágena vieja o dañada [47,85,86]. Particularmente, los fibroblastos inician la degradación de la colágena a través de la integrina $\alpha_2\beta_1$ [86]. Es posible que las integrinas solubles puedan impedir la unión de las integrinas membranales con la colágena, lo que evitaría su recambio generando su acumulación con la consecuente fibrosis subepitelial.

Se ha descrito que existe un incremento en la expresión de moléculas de adhesión a células vasculares 1 solubles (sVCAM-1) [7], ligandos de la subunidad β_1 de integrina en eosinófilos, por lo que esta expresión de integrinas solubles, que no estarían asociadas a estas células inflamatorias, podrían tratar de estar regulando la retención en el tejido de células que ocasionan la persistencia de la inflamación. De esta manera, al competir con los receptores membranales por su unión al ligando, las integrinas solubles podrían evitar la retención de eosinófilos en el tejido. Esto podría explicar porque el número de eosinófilos se mantuvo prácticamente en el mismo nivel independientemente de la cronicidad del asma.

8. CONCLUSIONES

- ↻ En este modelo de asma, se observó que la hiperreactividad de las vías aéreas y la respuesta broncoobstructiva inducida por el alérgeno, aparecen y se mantienen con la misma magnitud independientemente del desarrollo progresivo de la remodelación subepitelial.
- ↻ Una posible consecuencia funcional de los cambios estructurales en los animales crónicos es el aumento de la broncoobstrucción basal.
- ↻ Es probable que algún mecanismo homeostático preserve la magnitud de las respuestas funcionales independientemente de que las vías aéreas se estén remodelando.
- ↻ Las integrinas β_1 solubles podrían estar involucradas en la homeostasis de la función pulmonar, al mismo tiempo que contribuyen con la acumulación de componentes de matriz extracelular.

9. REFERENCIAS

1. West JB. 2002. *Fisiología Respiratoria*. 6º ed. Argentina. Ed. Médica Panamericana.
2. Ville CA. 1996. *Biología*. 8º ed. México. McGraw-Hill Interamericana.
3. Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M, Pack RJ, Paré PD, Schellenberg RR, Tiddens H, Warner EM, Yager D. *Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall*. J Appl Physiol. 1994;77:1011-1014.
4. Randal D, Burggren W, French K. 1997. *Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones*. 4º ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana.
5. Wang L MB, McParland BE, Pare PD. *The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma*. Chest 2003;Suppl 123:356S-362S.
6. The Global Burden of Asthma Report. GINA. 2005 Página electrónica: www.ginasthma.org.
7. Bousquet J, Jeffery P, Busse W, Johnson M, Vignola AM. *Asthma. From Bronchoconstriction to airways inflamtiós and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1720-1745.
8. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaf M, Bellia V, Bonsignore G. *Airway Remodeling in asthma*. Chest 2003;123:417S-422S.
9. Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. *How much do we know about atopic asthma: where are we now?* Cell and Mol Immunol 2006;3:321-332.
10. Herrero TV. *Remodelación de la vía aérea en el asma: fisiopatología de la matriz extracelular y función de los glicosaminoglicanos*. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2001;32.
11. Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. *Mechanisms of airway epithelial damage: epitelial-mesenchimal interactions in the pathogenesis of asthma*. Eur Respir J 2003;22: Suppl.44:24S-29S.
12. Peng Q, Lai D, Nguyen TT, Chan V, Matsuda T, Hirst SJ. *b1 integrins mediate enhancement of human airway smoot muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen*. J Immunol 2005;174:2258-2264.
13. Brusasco V, Crimi E, R Pellegrino. *Airway hyperresponsiveness in asthma: not just a matter of airway inflammation*. Thorax 1998;53:992-998.
14. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. *Airway remodeling in asthma: New insights*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:215-225.
15. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. 1997. *Patología Estructural y Funcional*. 5º ed. España. McGraw-Hill Interamericana. 1533 pp.
16. Des T. 1993. *Enfermedades respiratorias. Manifestaciones clínicas*. México. El manual moderno. 452 pp.
17. O'Byrne PM, Inman MD. *Airway hyperresponsiveness*. Chest 2003;Suppl 123:411S-416S.
18. Lapprise C, Boulet LP. *Asymptomatic Airway hyperresponsiveness: A Three-year Follow-up*. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:403-409.
19. Vargas MH. 2005. *Patogenia del asma. En: Asma. Enfoque integral para Latinoamérica*. México. McGraw-Hill Interamericana. 27-40 pp.
20. Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP. *Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relations with airway inflammation and remodeling*. Eur Respir J 1999;14:63-73.
21. Wilson JW, Bamford TL. *Assesing the evidence for remodeling of the airway in asthma*. Pulm Pharmacol & Ther 2001;14:229-247.
22. Ward C, Paris D, Bish R, Reid D, Feltis B, Jonhns D, Walters EH. *Airways inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asma*. Thorax 2002;57:309-316.
23. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwing MS, Martin JG, Q Hamid. *Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma*. J Allergy Clin Immunol 2005;116:544-549.
24. Boushey H. *New and exploratory therapies for asthma*. Chest 2003;123:439S-445S.

25. Nassensstein C, Kutscher J, Tumes D, Braun A. *Neuro-immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins*. Bioch Soc Trans 2006;34:591-593.
26. Neurant MF, Finotto S, Glimcher LH. *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. Nat Med 2002;8:567-573.
27. Taube C, Dakhama A, Takeda K, Nick JA, Gelfand EW. *Allergen-Specific Early Neutrophil Infiltration After Allergen Challenge in a Murine Model*. Chest 2003;Suppl 123:410S-411S.
28. Saetta M, Turato G. *Airway pathology in asthma*. Eur Respir J 2001;18 Suppl.34:18S-23S.
29. Howat WJ, Holmes JA, Holgate ST, Lackie PM. *Basement membrane pores in human bronchial epithelium. A conduit for infiltrating cells?* Am J Pathol 2001;158:673-679.
30. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies DE. *Bronchial Epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:S113-S117.
31. Hirota S, Helli PB, Catalli A, Chew A, Janssen LJ. *Airway smooth muscle excitation-contraction coupling and airway hyperresponsiveness*. Can J Physiol Pharmacol 2005;83:725-732.
32. Cockcroft DW, Davis B. *Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen*. Journal of Asthma 2006;43:175-178.
33. Abbas AH, Andrew H Lichtman. 2004. *Inmunología celular y molecular*. 5ª ed. Elsevier. Madrid. 563 pp.
34. van der Berge M, Kerstjens HA, de Reus DM, Kauffman HF, Koëter GH, Postma DS. *Provocation with adenosine 5'-monophosphate increases sputum eosinophils*. Chest 2003;123:417S.
35. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. *Airway remodeling in asthma*. J of Clin Inv 1999;104:1001-1006.
36. Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. *Airway remodeling and repair*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1035-1042.
37. Hirst ST. *Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma*. Respir Physiol Neurobiol 2003;137:309-326.
38. Ramos BD, Presley JF, Hamid QA, Fixman E, Martin JG. *Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma*. J Clin Invest 2005;115:1580-1589.
39. Slade D, Kraft M. *Airway Remodeling from bench to bedside: current perspectives*. Clin Chest Med 2006;27:71-85.
40. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. *The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma*. Immunol Cell Biol 2007;85:348-356.
41. Sobonya R. *Quantitative structural alterations in long-standing allergic asthma*. Am Rev Respir Dis 1984;130:289-292.
42. Bergeron C, Boulet LP. *Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation*. Chest 2006;129:1068-1087.
43. Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. *Airways remodelling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease*. Chest 1997;111:852-857.
44. McParland BE, Pare PD, Johnson PR, Armour C, Black JL. *Airway basement membrane perimeter in human airway is not constant, potential implications for airway remodeling in asthma*. J Appl Physiol 2004;97:556-563.
45. Maguire JE, Danahey KM, Burkly LC, van Seventer GA. *T Cell receptor and b1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125 FAK) in human T cells*. J Exp Med 1995;182:2079-2090.
46. Sheppard D. *Airway epithelial integrins: Why so many?* Am J Respir Cell Mol Biol 1998;19:349-351.
47. Boudreau JP, Jones PL. *Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come*. Biochem J 1999;339:481-488.
48. Liu S, Calderwood DA and Ginsberg MH. *Integrin cytoplasmic domain-binding proteins*. J Cell Sci 2000;113:3563-3571.
49. Hynes R. *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell 2002;110:673-687.
50. Takada Y, Ye X, Simon S. *The integrins*. Genome Biol 2007;8:215.

51. van der Flier A, Sonnenberg A. *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res 2001;305:285-298.
52. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. *Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin*. Cell 1986;46:271-282.
53. Nguyen TT, Ward JP, Hirst SJ. *β 1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin*. Am J Respir Crit Care Med 2005;114:2553-2560.
54. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. *Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma*. J Clin Invest 1998;101:2129-2139.
55. Abraham WM, Ahmed A, Serebriakov I, Carmillo AN, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber EA, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Taylor F, Lobb RR. *A monoclonal antibody to α 1 β 1 blocks antigen-induced airway responses in sheep*. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:97-104.
56. Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, Hu Y and Xu Q. *Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin α 1 β 1/ α v and PDGF receptor pathways*. Am J Physiol Cell Physiol 2007;292:C342-C352.
57. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β 1-integrin-linked protein kinase*. Nature 1996;379:91-96.
58. Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP. *Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase*. Biochem J 2002;367:517-524. Biochem J 2002;367:517-524.
59. Delacourt C. *Bronchial changes in untreated asthma*. Arch Pediatr 2004;Suppl 2:71S-73S.
60. Karol MH. *Animal models of occupational asthma*. Eur Respir J 1994;7:555-568.
61. Campos MG, Toxqui E, Tortoriello J, Oropeza MV, Ponce H, Vargas MH, Montaña LM. *Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD4-induced contraction in guinea pig airways*. Ethnopharmacol 2001;74:7-15.
62. Bazán PB, Vargas MH, Sánchez GE, Chávez J, Montaña LM. *Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide*. Exp Physiol 2004;89:623-628.
63. Chávez J, Segura P, Vargas MH, Arreola JL, Flores-Soto E, Montaña LM. *Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in guinea pigs: role of substance P release*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. in press.
64. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. *Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography*. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:766-775.
65. Chávez J, Montaña LM, Sommer B, Gustin P, Vargas MH. *Obstrucción de las vías aéreas en un modelo de intoxicación por paratión en cobayos*. Neumol Cirugía Tórax 1996;55:49-54.
66. Drorbaugh JE, Fenn WO. *A barometric method for measuring ventilation in newborn infants*. Pediatrics 1955;16:81-87
67. Epstein MA, Epstein RA. *A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume*. Respir Physiol 1978;32:105-120.
68. Sommer B, Vargas MH, Chavez J, Carbajal V, Segura P, Montaña LM. *Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O3-induced hyperresponsiveness*. J Appl. Physiol 2001;91:2595-2601.
69. Holtzman MJ, Fabbri LM, O'Byrne PM, Gold BD, Aizawa H, Walters EH, Alpert SE, Nadel JA. *Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone*. Am Rev Respir Dis 1983;127:686-690.
70. Taube C, Dakhama A, Takeda K, Nick JA, Gelfand EW. *Allergen-Specific Early Neutrophil Infiltration After Allergen Challenge in a Murine Model*. Chest 2003;Suppl 123:410S-411S.
71. Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. *Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice*. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:721-730.

72. Yamauchi K. *Airway remodelling in asthma and its influence on clinical pathophysiology*. Tohoku J Exp Med 2006;209:75-87.
73. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. *Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;280:H1427-H1433.
74. Montaña LM, Bazán PB. *Resting calcium influx in airway smooth muscle*. Can J Physiol Pharmacol 2005;83:717-723.
75. Stupack DG. *Integrins as a distinct subtype of dependence receptors*. Cell Death and Differentiation 2005;12:1021-1030.
76. Zhang W, Gunst S. *Dynamic association between α -actinin and β -integrin regulates contraction of canine tracheal smooth muscle*. J Physiol 2006;572:659-676.
77. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Käpylä J, White DJ, Ivaska J, Vehviläinen P, Reunanen H, Larjava H, Häkkinen L, Heino J. *Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils*. J Biol Chem 2004;279:31956-31963.
78. Weinacker A, Chen A, Agrez M, Cone RI, Nishimura S, Wayner E, Pytela R, Sheppard D. *Role of the integrin α v β 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor*. J Biol Chem 1994;269:6940-6948.
79. Mathias P, Galleno M, Nemerow GR. *Interactions of soluble recombinant integrin α v β 5 with human adenoviruses*. J Virol 1998;72:8669-8675.
80. Kainoh M, Tanaka T. *Production of soluble integrin α 2 β 1 heterodimer complex functionally active in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 2002;290:305-310.
81. Levine SJ. *Mechanisms of soluble cytokine receptor generation*. J Immunol 2004;173:5343-5348.
82. Rose-John S. *Cytokine Receptors*. In *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0003979., 2005:pág. 1-6.
83. Albright AJ, Albright J. *Soluble receptors and other substances that regulate proinflammatory cytokines in young and aging humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2000;55:B20-B25.
84. Protonotariou E, Rizos D, Malamits PA, Moira AS, Salamalekis E. *Cytokine soluble receptors in perinatal and inflammation*. Mediators of inflammation 2003;12:185-188.
85. Dodig M, Ogunwale B, Dasarathy S, Li M, Wang B, McCullough AJ. *Differences in Regulation of Type I Collagen Synthesis in Primary and Passaged Hepatic Stellate Cell Cultures; The role of α 5 β 1 Integrin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;293:G154-G164.
86. Lee W, Sodek J. *Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts*. J Cell Physiol 1996;168:695-704.