



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Relación entre la expresión de caveolina-1 en el músculo liso de las vías aéreas y el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma alérgica en el cobayo”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

GERMÁN FERNANDO GUTIÉRREZ AGUILAR

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

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

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

MÉXICO, D.F. AGOSTO, AÑO 2013



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
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Relación entre la expresión de caveolina-1 en el músculo liso de las vías aéreas y el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma alérgica en el cobayo”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

GERMÁN FERNANDO GUTIÉRREZ AGUILAR

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

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

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

MÉXICO, D.F. AGOSTO, AÑO 2013


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director 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 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)** del alumno **GUTIÉRREZ AGUILAR GERMÁN FERNANDO** con número de cuenta **303164568** con la tesis titulada **"RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CAVAOLINA-1 EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AEREAS CON EL DESARROLLO DE HIPERREACTIVIDAD EN UN MODELO DE ASMA ALERGICA EN EL COBAYO"** realizada bajo la dirección del **DRA. BLANCA MARGARITA BAZAN PERKINS**:

Presidente: **DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES**
Vocal: **DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**
Secretario: **DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**
Suplente: **DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN**
Suplente: **DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de mayo de 2013



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Así mismo al CONACYT, (CVU 365585; becario 245537) por su imprescindible apoyo en el tiempo que duró el programa.



A los miembros de mi comité Tutoral, cuya guía fue indispensable para la realización de este trabajo:

Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

Agradecimientos
A título personal

A mi preciada familia, que ha sido inspiración, motivación y mi ejemplo a seguir.

Un especial reconocimiento de mi parte a la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins cuya participación en mi formación ha sido incomparable, gracias a su apoyo incondicional, comprensión y cariño.

A mis compañeros de laboratorio por la dedicación y paciencia al instruirme en los rubros necesarios para el desarrollo del trabajo como la Dra. María del Carmen Arenas del Ángel.

A los miembros del jurado que me apoyaron en todo momento y bajo cualquier circunstancia.

Dr. Mario Israel Vega Paredes
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
Dra. Diana Elodia Aguilar León
Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

A mis queridos amigos, sin los cuales una formación integral no sería posible. Les comparto un pequeño escalón, en la enorme trayectoria que aún nos espera.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", cuyas instalaciones y personal fungieron como una herramienta versátil y como agentes ejemplares en mi formación profesional.



Finalmente agradezco a todas las personas que han estado, están y estarán en mi camino, por cada palabra de aliento, por cada vehemente y prolija reprimenda; porque de cada una he aprendido algo trascendente.

El talento se educa en la calma y el carácter en la tempestad.

GOETHE, Johann Wolfgang von

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
Vías aéreas	7
Asma.....	7
Características de la HVA	8
Características del MLVA.....	9
Caveolas	10
Cav-1.....	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Animales.....	14
Procedimiento de sensibilización.....	14
Pletismografía	15
Reactividad de las vías aéreas	16
Reacción en cadena de la polimerasa	17
Disgregación celular	18
Citometría de flujo	19
Inmunohistoquímica	19

Western Blot	20
Hemodinamia	21
Colocación de catéteres	21
RESULTADOS	23
Broncoobstrucción inducida por el alérgeno en el modelo de asma alérgica	23
Reactividad de las vías aéreas	24
Expresión de Cav-1 en el tejido pulmonar	24
Expresión de Cav-1 en los miocitos	25
Relación entre las variables fisiológicas y la cantidad de miocitos que expresan Cav-1	26
Expresión de Cav-1 en el tejido pulmonar	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34

RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas que se manifiesta mediante obstrucción reversible e inestabilidad de las vías aéreas debido a que las respuestas celulares, como la liberación de mediadores pro-inflamatorios, interleucinas etc. de las estructuras que la conforman se encuentran alteradas. Esta inestabilidad induce que las vías aéreas sean muy reactivas (hiperreactivas) ante cualquier estímulo, tanto físico como químico. Un componente central en el desarrollo de hiperreactividad es el músculo liso. Éste presenta abundantes estructuras membranales conocidas como caveolas que se caracterizan por que contienen la proteína caveolina-1 (Cav-1).

Tanto las caveolas como la Cav-1 han sido ampliamente estudiadas debido a su gran importancia en la contracción muscular; no obstante, aún se ignora la relación entre la expresión de Cav-1 con el desarrollo de hiperreactividad en las vías aéreas. Nuestro objetivo fue evaluar la relación entre la expresión de Cav-1 con el proceso de contracción e hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Se sensibilizaron al antígeno (ovoalbúmina, OVA) cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH y se retaron con el mismo antígeno cada 10 días. En el tercer reto antigénico se evaluó la contracción inducida por OVA y la reactividad a la histamina *in vivo* mediante pletismografía barométrica. La expresión de Cav-1 mediante citometría de flujo, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real “RT-PCR”, inmunohistoquímica y detección de proteínas específicas por el sistema inmunolectrotransferencia “Western blot”. Se incluyó un grupo control de cobayos a los que se administró solución salina fisiológica. En cada reto antigénico se evaluó el cambio en el índice de broncoobstrucción (ÍB) inducido por el antígeno y los valores basales de ÍB (obtenido antes de los retos) mediante pletismografía barométrica.

Los cobayos del modelo de asma presentaron hiperreactividad a la histamina, broncoobstrucción después de la administración de OVA, incremento de los niveles basales de ÍB y disminución en la expresión del RNAm de Cav-1 en el pulmón. Mediante citometría de flujo en miocitos traqueales aislados se observó un incremento de la expresión de Cav-1 que se asoció con la magnitud de la hiperreactividad, niveles basales de ÍB y de la obstrucción inducida por el reto antigénico. Las imágenes de inmunohistoquímica no mostraron cambios evidentes en la marca de Cav-1 en el músculo liso de las vías aéreas, pero evidenció una disminución en la expresión de la proteína en el músculo liso vascular en los cobayos del modelo de asma. Esta disminución de Cav-1 en el tejido vascular de los cobayos del modelo de asma se acompañó de un incremento en el grosor del músculo liso vascular; sin embargo no se observaron cambios en la presión arterial pulmonar ni de la presión sistémica.

En conclusión, la expresión de Cav-1 en el músculo liso de la vía aérea se relaciona con la magnitud de la obstrucción e hiperreactividad en el modelo de asma alérgica en cobayo. Es probable que la disminución de Cav-1 en el músculo liso vascular en el modelo de asma genere un fenotipo diferente al del músculo liso de la vía aérea, probablemente de carácter proliferativo más que contráctil.

ABSTRACT

Asthma is an airway chronic inflammatory disease manifested by reversible airway obstruction and airway instability induced by altered structural and cellular responses. Airway instability increases the reactivity (hyperresponsiveness) of airways to any stimulus, physical and chemical. Airway smooth muscle has a central role in the development of hyperresponsiveness. A main feature of smooth muscle is the presence of membrane structures known as caveolae.

Although caveolae and Cav-1, the most common protein in caveola, have crucial roles in muscle contraction; it is unknown the relationship between Cav-1 expression and the development of airway hyperresponsiveness. The aim of the current study was to evaluate the role of Cav-1 expression in the development of airway obstruction and hyperresponsiveness in a model of allergic asthma in guinea pig. Male guinea pigs (strain HsdPoc: DH) were sensitized and challenged to antigen (ovalbumin, OVA) every 10 days. At the third antigen challenge, the reactivity to histamine was determinate. Cav-1 expression was obtained by flow cytometry, real time polymerase chain reaction "RT-PCR", immunohistochemistry and immunoblotting by western blot. We included a control group of guinea pigs that received only saline in challenges. In each antigen challenge, the maximum obstructive response and the baseline value (obtained before challenge) were measured by barometric plethysmography.

The antigen challenge induced hyperresponsiveness to histamine, airway obstruction and low expression of Cav-1 mRNA in lung. In contrast, an increment of Cav-1 expression was observed in isolated tracheal myocytes that was associated to airway hyperresponsiveness degree and antigen-induced airway obstruction magnitude. Immunohistochemical images did not show changes in Cav-1 expression in airway smooth muscle from controls and antigen challenged guinea pigs; nevertheless, a reduction of Cav1 expression was detected in vascular smooth muscle from antigen challenged guinea pigs in comparison with controls. In addition, the vascular mass from antigen challenged guinea pigs was thicker than controls. Finally, the pulmonary arterial and systemic pressures from antigen challenged and control guinea pigs were not different.

In conclusion, the data suggest that Cav-1 expression in airway smooth muscle has a crucial role in the process of airway hyperresponsiveness in asthma model in guinea pig. It is likely that vascular smooth muscle is downregulated in this asthma model inducing a different phenotype in comparison with airway smooth muscle, probably more than contractile, as the airway smooth muscle, a proliferative profile.

ABREVIATURAS

MLVA	-----	Músculo liso de las vías aéreas
HVA	-----	Hiperreactividad de las vías aéreas
Ca²⁺	-----	Ion Calcio
IP₃	-----	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
CaM	-----	Calmodulina
Cav-1	-----	Caveolina-1
OVA	-----	Ovoalbúmina
SSF	-----	Solución salina fisiológica
ÍB	-----	Índice de broncoobstrucción
PD₂₀₀	-----	Dosis provocativa 200
GAPDH	-----	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
PAS	-----	Presión arterial sistémica
PAP	-----	Presión arterial pulmonar

INTRODUCCIÓN

Vías aéreas

El pulmón interactúa con el medio ambiente a través de miles de litros de aire inhalado diariamente. El aire transporta partículas, microorganismos patógenos, agentes tóxicos y alérgenos que son llevados por una serie de conductos hasta lo más profundo del sistema respiratorio (Downs *et al*, 2007; Trompette *et al*, 2009).

El sistema respiratorio en mamíferos se compone de nariz, faringe, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos, y todas estas estructuras son conocidas como vías aéreas, que son los sitios de conducción de aire, salvo los alvéolos que son la zona de intercambio gaseoso para el proceso de la respiración. Las vías aéreas se ponen a prueba en presencia de agentes nocivos del medio ambiente, porque parte de su función es evitar que se afecte el sistema respiratorio, permitiendo simultáneamente un intercambio gaseoso eficiente (Burri, 2011; Downs *et al*, 2007). No obstante, la protección de las vías aéreas es conferida por células especializadas denominadas células del sistema inmune, las cuales pueden ser del sistema inmune innato o adaptativo. La alteración en cualquier nivel celular o estructural causada por el medio ambiente o bien por algún componente genético, puede generar un desorden fisiopatológico en las vías aéreas, donde el más común es el asma.

Asma

El asma es una de las enfermedades crónicas tratables más comunes a nivel mundial que, debido a su naturaleza crónica, representa una significativa carga económica para el paciente (GINA, 2012). Los síntomas comunes del asma incluyen opresión en el pecho, respiración sibilante y tos, que son reversibles de manera espontánea o con el tratamiento adecuado. El tratamiento es generalmente inhalar corticosteroides o bien administrar broncodilatadores como agonistas β -adrenérgicos. Pero inhalar corticosteroides puede causar efectos pleiotrópicos a largo plazo, mientras que los broncodilatadores actúan de manera efímera, es decir, ambos tratamientos son insuficientes para resolver el problema por completo (EPR-3, 2007; Xu *et al*, 2012).

La obstrucción episódica de las vías aéreas es debido principalmente al aumento en la secreción de moco, al engrosamiento de las vías aéreas por la inflamación (remodelación) y a la contracción del músculo liso de la vía aérea (MLVA) (Vargas, 2009), ya que las respuestas celulares de las estructuras que la conforman se encuentran alteradas por la inflamación crónica. Esta inflamación es principalmente de carácter eosinofílico, aunque también participan diversos tipos de células y elementos como los linfocitos Th2, células cebadas, citocinas, interleucinas y neutrófilos. Todos estos componentes se ven sobreexpresados o alterados a causa de una respuesta inmune aberrante (Brown *et al*, 2012). Las afectaciones resultantes como fibrosis y daños celulares, se observan principalmente en células endoteliales, fibroblastos y, por supuesto, células del músculo liso (Vargas, 2009), siendo estas estructuras también origen de la secreción de mediadores inflamatorios en el asma (KAACI, 2007).

Los mecanismos precisos en el desarrollo del asma son aún poco elucidados debido a diversos factores como la heterogeneidad de la enfermedad, el tipo alérgica (extrínseca) o no alérgica (intrínseca), y a las diferencias notables entre el asma de adultos y de niños; no obstante, el principal componente en la fisiopatología del asma, en cualquier variante de la enfermedad y bajo cualquier clasificación en su intensidad (moderada o grave), es la hiperreactividad en las vías aéreas (HVA) (Cockcroft y Davis, 2006; O'Byrne, 2003; Xu *et al*, 2012).

Características de la HVA

La HVA es esencialmente un desequilibrio en las vías aéreas que se refleja en una reducción fácil y rápida de la luz de la vía ante cualquier estímulo tanto físico como químico (Annaig *et al*, 2011; Buc *et al*, 2009; Cockcroft y Davis, 2006; Wang *et al*, 2012). No solo el asma presenta este fenómeno, otras enfermedades también son desencadenantes de HVA, como es el caso de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, rinitis, o incluso un resfriado común, donde la HVA es a veces transitoria (Kim y Rubin, 2007), pero no existe ningún tipo de asma sin el componente de HVA.

Aunque la HVA es la característica fisiopatológica más importante del asma, aún se ignora el mecanismo preciso involucrado en su desarrollo (O'Byrne, 2003; Ray y Cohn, 1999; Yin *et al*, 2008). Una estructura central en el desarrollo de la inestabilidad en las vías aéreas es el MLVA.

Existen teorías que sustentan el origen de la HVA en tres rubros (Annaïg *et al*, 2011; Black y Roth, 2009; Dekkers *et al*, 2009; Zuyderduyn *et al*, 2008). El primero, por una liberación más prolongada de los mediadores contráctiles del MLVA; el segundo, por una disminución de la secreción en los mediadores de relajación para esta misma estructura; y tercero, un aumento en la excitabilidad para la contracción conjugado con la alteración en el acoplamiento del mecanismo contráctil (Annaïg *et al*, 2011).

Características del MLVA

De forma natural el MLVA funge como soporte para estructuras no cartilaginosas, además previene de la entrada e inhalación de agentes tóxicos para el organismo mediante su contracción, ya que está presente en todos los niveles del árbol traqueobronquial (Vargas, 2009).

La contracción del MLVA es un proceso muy parecido al de sus homólogos, el músculo cardiaco, el músculo estriado e incluso el músculo liso vascular; esto es porque el Calcio (Ca^{2+}) necesario para llevar a cabo el proceso de contracción proviene mayoritariamente de los reservorios intracelulares, principalmente del retículo sarcoplásmico (Thirstrup, 2000). Con un incremento agudo y rápido en la concentración de Ca^{2+} (de 100-200 nM a 800-1000 nM), se puede activar el citoesqueleto para que se lleve a cabo la contracción del músculo. El incremento de Ca^{2+} se da mediante la activación de un receptor acoplado a una proteína G, y ésta intercambia GDP por GTP, lo que activa a la subunidad alfa que a su vez activa a la fosfolipasa C- β , la cual hidroliza fosfolípidos generando dos segundo mensajeros, diacilglicerol e inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 viaja hasta su receptor ubicado en el retículo sarcoplásmico, promoviendo la liberación de Ca^{2+} al medio intracelular. El aumento en la concentración intracelular del ion genera un cambio en el voltaje celular, permitiendo la apertura de otros canales de Ca^{2+} como los canales operados por almacén, canales operados por receptor y canales operados por voltaje (Berridge, 1993; Hall, 2000; Nuttle y Farley, 1996; Pelaia *et al*, 2008).

El incremento masivo de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma estimula la unión del Ca^{2+} con la calmodulina (CaM), proteína citosólica con cuatro sitios de unión a Ca^{2+} , formando el complejo CaM- Ca^{2+} cuya función es activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina, que fosforila específicamente al residuo serina-19 ubicado en la miosina. La fosforilación de la miosina

promueve los movimientos de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina, proceso que en resumen denominamos, contracción. El proceso culmina mediante la acción de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, que remueve la fosforilación induciendo relajación. Al mismo tiempo la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico restaura las concentraciones basales de Ca^{2+} dentro del citoplasma regresándolo al retículo sarcoplásmico (Berridge, 1993; Hall, 2000; Nuttle y Farley, 1996; Pelaia *et al*, 2008).

Cuando el MLVA presenta un desequilibrio en el mecanismo de contracción-relajación en el asma, esta estructura representa más que una protección funcional, una poderosa causa de obstrucción exacerbada. Porque se modifican mecanismos que interfieren con el manejo del ion Ca^{2+} . En conjunto estos mecanismos son denominados sensibilización a Ca^{2+} porque con un ligero aumento intracelular del ion, y aún inclusive siendo retirado del medio citosólico, la contracción se mantiene (Pelaia *et al*, 2008; Somlyo, 1994, 2003).

Como resultado de la sensibilización al Ca^{2+} , la maquinaria contráctil reduce drásticamente el calibre de la vía aérea ante cualquier estímulo generado por la activación de receptores de membrana, de vías neuronales o de liberación de agonistas provenientes de células inflamatorias (Somlyo, 2003). Los mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} se atribuyen a la vía de cinasas RhoA/Rho y al sistema efector PKC/CPI-17, moléculas relacionadas estrechamente con una proteína importante en el proceso de contracción del MLVA, la caveolina-1 (Cav-1). Notablemente el MLVA es abundante en Cav-1, una proteína estructural de la subclase de balsas lipídicas de la membrana plasmática conocidas como caveolas (Peters, 1985).

Caveolas

Las caveolas son oligómeros de Cav-1 que se adhieren a la superficie interna de la membrana plasmática generando una invaginación de 50 a 100 nm de diámetro en forma omega (Ω) y que participan en diferentes vías de señalización (Hunter y Nixon, 2006; Taggart *et al*, 2000). De esta forma, las caveolas forman plataformas que hacen eficiente la señalización para diversas vías, como la movilización de Ca^{2+} , muy probablemente uniéndose con otras caveolas de acuerdo con la función que desempeñen (Simons y Toomre, 2000).

Las caveolas son estructuras primordiales en la modulación de la señalización celular (Bergdahl, 2004; Gosens *et al*, 2008; Halayko *et al*, 2008), incluyendo la movilización de Ca^{2+} intracelular durante la contracción (Darby, 2000; Gosens *et al*, 2007). La presencia de canales de Ca^{2+} tipo L, canales de Ca^{2+} operados por almacén, la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, receptores para agonistas (como los muscarínicos M3, los de bradicinina, y los de histamina H1), así como de proteínas que unen Ca^{2+} (como calsecuestrina y calreticulina), en las membranas enriquecidas con caveolas apoyan la participación de estas estructuras durante la contracción (Darby *et al*, 2000; Prakash *et al*, 2007). También se ha reportado que la contracción inducida por la señalización de los receptores muscarínicos M2 (y también M3), requiere el funcionamiento íntegro de las caveolas (Schlenz *et al*, 2010). Sharma y colaboradores (2010) observaron una disminución en la liberación de Ca^{2+} intracelular cuando se inducía la desorganización del arreglo en la caveola. Por último, también se ha realizado la interrupción transitoria de la regulación caveolar por medio del propofol, fármaco anestésico que por su naturaleza lipídica induce desorganización caveolar, produciendo de esta forma broncodilatación (Grim *et al*, 2012).

Cav-1

La síntesis de Cav-1 se lleva a cabo en el retículo sarcoplásmico donde se ensamblan homo-oligómeros estables (entre 14 y 16 unidades de Cav-1), dirigidos a la membrana para formar caveolas (Monier, 1995). Además de Cav-1, existen otros dos tipos de caveolina, la 2 y la 3. La tipo 3 se encuentra mayoritariamente en músculo esquelético y la tipo 2 necesita unirse a alguna de los otros dos tipos para poder anclarse a la membrana, razón por la que algunas caveolas son hetero-oligómeros (Gosens *et al*, 2008; Scherer *et al*, 1996; Mora, 1999; Parolini *et al*, 1999).

Estructuralmente la Cav-1 presenta un dominio de oligomerización, un dominio de unión para proteínas de andamiaje (*CSD domain*, por su siglas en inglés) y por supuesto los sitios de anclaje a la membrana palmitoilados (Fig.1).

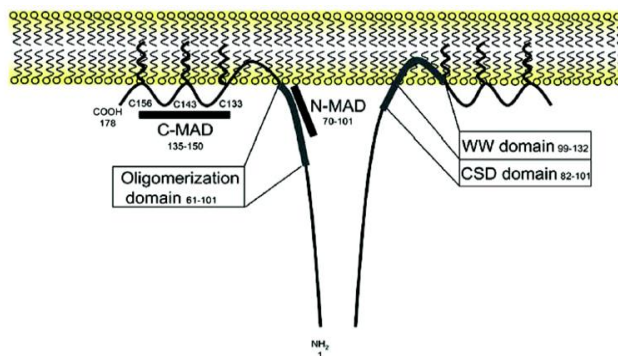


Figura 1. Esquema donde se muestran las palmitoilaciones responsables de la unión de Cav-1 a la membrana, así como la ubicación de los distintos dominios que la proteína presenta (Modificado de Pelaia *et al*, 2008).

Es debido a los dominios de unión a distintas proteínas que Cav-1 es tan eficiente en la organización de vías de señalización y regulación de homeostasis celular. No obstante, también puede verse alterada su función cuando el sistema está en desequilibrio; por ejemplo, en presencia de la citocina TNF- α , Cav-1 induce la activación de RhoA (Hunter y Nixon, 2006) que promueve un aumento en la fuerza de respuesta hacia agonistas contráctiles como acetilcolina, bradicinina e histamina (Sathish *et al*, 2011). Asimismo, se ha visto que el reclutamiento a la membrana plasmática de componentes de la sensibilización a Ca^{2+} como RhoA y PKC α durante la contracción, es dependiente de Cav-1 (Hunter y Nixon, 2006; Taggart *et al*, 2000). Por estas evidencias sabemos que las caveolas y, su proteína estructural Cav-1, facilitan la movilización de Ca^{2+} intracelular llevando a la contracción del MLVA (Gosens *et al*, 2007).

Finalmente, en el MLVA, la Cav-1 suprime la proliferación de los miocitos y se expresa principalmente en miocitos maduros que se caracterizan por ser contráctiles (Gosens *et al*, 2006). En este sentido, Cav-1 inhibe la actividad constitutiva de p42/p44 MAPK para mantener la quiescencia celular; es decir, genera un fenotipo no proliferativo (Gosens *et al*, 2006), mientras da prioridad a la función contráctil. Por tanto, las caveolas son un indicio de un fenotipo maduro, no proliferativo y contráctil en el MLVA (Halayko *et al*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito en un modelo de asma que la expresión de Cav-1 en el pulmón de ratones se encuentra disminuida (Le Saux *et al*, 2008), observación confirmada por Chen y colaboradores en 2011 quienes reportaron de igual forma en modelo de asma, una significativa disminución en la expresión de RNAm de Cav-1 en el tejido pulmonar. Por otro lado, para llevar a cabo una eficiente contracción en el MLVA, cuya estructura es central en el desarrollo de HVA por su capacidad para reducir drásticamente el calibre de las vías aéreas, es necesaria la función intacta de Cav-1 que tiene un importante papel en la regulación de la contracción y homeostasis del MLVA (Bergdahl, 2004; Darby, 2000; Gosens *et al*, 2006, 2007, 2008, 2011; Halayko *et al*, 2008; Hunter y Nixon, 2006; Le Saux *et al*, 2008; Prakash *et al*, 2007; Taggart *et al*, 2000) . Por lo que una baja expresión del transcrito de esta proteína resulta incongruente debido a la crucial importancia de Cav-1 en el proceso de contracción del MLVA y por ende en la HVA. Ante lo contradictorio de estas observaciones en relación con la función de la Cav-1, consideramos importante evaluar si la disminución de la expresión de Cav-1 en el pulmón, incluye una estructura importante en el desarrollo de la HVA como es el MLVA, puesto que en ningún otro estudio se ha relacionado a Cav-1 con la HVA.

HIPÓTESIS

La expresión de Cav-1 en el MLVA correlaciona con la magnitud de la HVA.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre la expresión de Cav-1 en el MLVA con el grado de HVA en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la relación entre la reactividad de las vías aéreas a la histamina con la expresión de Cav-1 en el MLVA en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

2. Evaluar si la magnitud de las respuestas obstructivas al reto antigénico se relaciona con la expresión de Cav-1 en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cobayos machos sanos de la raza HsdPoc: DH con pesos aproximados de 350 a 450 g, mantenidos en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Procedimiento de sensibilización

Día 1: Los cobayos fueron sensibilizados por vía parenteral con 1 ml de una solución 0.3 mg/ml ovoalbúmina (OVA, Sigma) y 30 mg/ml de hidróxido de aluminio (J.T. Baker) como adyuvante. Utilizamos como vehículo solución salina fisiológica (SSF).

A los cobayos controles se les administró una inyección con el mismo volumen pero de SSF (Fig. 2).

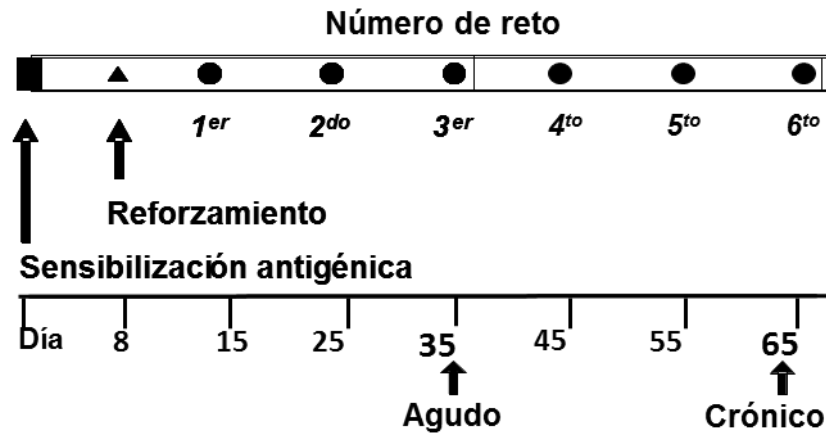


Figura 2. Esquema de sensibilización y administración de retos antigénicos.

Pletismografía

Día 8: Se reforzó la inmunización utilizando aerosoles de OVA (3 mg/ml SSF). Los aerosoles se administraron durante 5 min y se produjeron con un nebulizador US-Bennet (diámetro de partícula de 7-9 μm , flujo de 2 ml/min).

Día 15: Los cobayos sensibilizados con la OVA se colocaron en un pletismógrafo barométrico (BuxcoElectronics) donde se determinaron los valores basales del índice de broncoobstrucción (íB). Durante el registro pletismográfico se administró un flujo constante de aire (10 ml/s). La señal de la cámara se procesó con un programa de computadora (BuxcoBiosystem XA v1.1). El íB se obtuvo con la siguiente fórmula (Hamelmann *et al*, 1997):

$$\text{íB} = ((\text{Te}-\text{Rt})/\text{Rt}) (\text{PEP}/\text{PIP})$$

Donde:

Te= tiempo total de espiración (s) PEP= magnitud del pico de presión espiratoria (cmH₂O)

Rt= tiempo total de relajación (s) PIP= magnitud del pico de presión inspiratoria (cmH₂O)

Posteriormente se retó al cobayo con el alérgeno (OVA) durante 1 min (1 mg OVA/ml SSF; Bazán-Perkins *et al*, 2009) y se registró el íB durante 1 hora (Fig. 3).

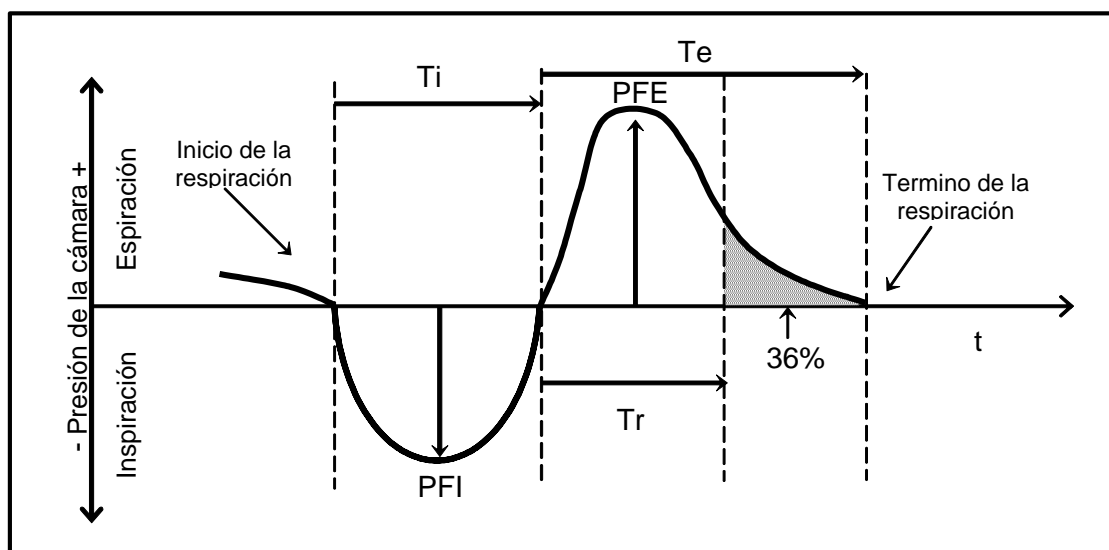


Figura 3. Esquema de los cambios de presión dentro de la cámara durante la inspiración y la espiración en un ciclo respiratorio obtenido mediante pletismografía barométrica en un cobayo en libre movimiento. El tiempo inspiratorio (T_i), es el intervalo de tiempo ocurrido desde el inicio de la inspiración hasta el final de ésta. El T_e comprende el siguiente intervalo que inicia desde el final de la inspiración hasta el inicio de la siguiente. El T_r es el tiempo que transcurre entre el inicio de la espiración hasta que el volumen corriente disminuya al 36% durante la espiración. El PFE y el PFI se obtienen midiendo la presión positiva y negativa máximas registradas en un ciclo respiratorio. Modificado de Hamelmann *et al*, 1997.

Se siguió un protocolo similar al del día 15 cada diez días hasta el día 65 pero la dosis de OVA fue de 0.5 mg/ml debido a que es la dosis ideal para no generar a los animales un shock anafiláctico. Los cobayos controles recibieron SSF durante los retos.

Reactividad de las vías aéreas

La histamina es un autacoide que funciona como agonista contráctil en el MLVA, útil para inducir obstrucción en las vías aéreas (Barnes, 1998). La reactividad de las vías aéreas fue evaluada comparando las curvas dosis respuesta a la histamina antes y después de la última administración de OVA.

Para el modelo agudo el protocolo se realizó hasta el tercer reto con OVA (día 35), mientras que para el modelo crónico el procedimiento continuó hasta el sexto reto (día 65). Inicialmente se obtuvo el \dot{V}_B basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma) durante 1 min. Para cada dosis se registró el \dot{V}_B 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 triplicó el valor basal del \dot{V}_B (Dosis provocativa 200 o PD₂₀₀). Después se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un \dot{V}_B aproximado al 50% del valor basal (Bazán-Perkins *et al*, 2004), y se retó 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. Veinticuatro horas después de terminada la segunda curva de histamina, a los cobayos se les aplicó eutanasia mediante una sobredosis con pentobarbital sódico. Una vez que los cobayos presentaron paro cardiorrespiratorio, se les realizó una incisión en el cuello y tórax para disecar la tráquea y extraer el tejido pulmonar caudal izquierdo.

Reacción en cadena de la polimerasa

Los niveles relativos de expresión de Cav-1 fueron medidos en el tejido pulmonar macerado, por una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa, las dos secuencias de los cebadores fueron obtenidas por Gibco (Gaithersburg, MD). Para Cav-1 los cebadores en dirección sentido fueron 5-ATG-TCTGGG-GGT-AAA-TAC-GT-3 y los de antisentido fueron: 5-CCT-TCT-GGT-TCC-GCA-ATC-AC-3, que amplificaron un fragmento de 230 pares de bases, de la base 1 a la 230. Para evaluar o reducir los efectos inespecíficos del tratamiento experimental y semicuantificar la expresión de Cav-1, se amplificó un fragmento de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La reacción se llevó a cabo utilizando 2.5 μ g de RNA total a partir de tejido pulmonar. Antes de la reacción, el RNA total se calentó a 65°C durante 10min. La reacción se realizó a 37°C durante 60 min en un volumen total de 20 μ l utilizando 200 μ mol/ μ l de la enzima transcriptasa reversa (Gibco), 100 pmol de hexámeros aleatorios (Gibco) 0.5 mM de cada dNTP (Sigma) y un buffer RT (75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3).

Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min para inactivar la transcriptasa reversa y se diluyó en 40 µl de agua con pureza de grado PCR. Una décima parte de las muestras individuales de cada grupo se utilizó para cada amplificación de GAPDH en 20µl (volumen final) con tampón 1X que contienen: Solución Tampón de PCR (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH8.3 en agua destilada), 0.1 mM de cada dNTP, 0.2 Ci de [32P]-dCTP (3000 Ci / mmol, 9.25 MBq, 250 Ci), 10 µM de cada cebador, y una unidad de la DNA polimerasa Taq (Gibco). Las muestras se cubrieron con 30 µl de aceite mineral y los ciclos de PCR se realizaron en un termociclador (MJ Research), con el siguiente perfil: Desnaturalización 1 min a 94°C y alineación 1 min a 55°C. Finalmente una extensión de 5 min a 72°C. El gen de control se coamplificó simultáneamente en cada reacción.

Disgregación celular

A la tráquea se le eliminó la fascia superficial para seccionarla dorsalmente a lo largo de su eje. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se quitaron las capas de mucosa, epitelio, serosa y vasos sanguíneos hasta obtener una tira continua de músculo liso. Esta tira fue incubada en 5 ml de solución Hank's (Gibco) adicionada con 2 mg de cisteína y 0.05 U/ml de papaína (enzimas proteolíticas) durante 10 min a 37°C. Posteriormente, el tejido fue lavado con solución de Leibovitz (Gibco) para remover el exceso de enzima y después se colocó en solución de Krebs (composición: 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4.6 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄ y 11 mM de glucosa, todos de Sigma) que contenía 100 µl de Liberasa (Roche). En solución fresca se llevó a cabo una segunda incubación durante 10 min a 37°C hasta que las células se disgregaron. Se corroboró la disgregación mediante la obtención de alícuotas que se observaron en un microscopio (Olympus, modelo CH30LF100). Una vez disgregadas las células, toda actividad enzimática fue inhibida completamente adicionando solución de Leibovitz (Gibco). Las células fueron concentradas mediante dos centrifugaciones a 600 rpm durante 5 min, separadas por un lavado con solución Leibovitz (Gibco).

Citometría de flujo

Las células de músculo liso disgregadas (1×10^6) se incubaron por cuatro horas a 37°C en “baño maría” en 1 ml de RPMI (Gibco) y 4 μl de brefeldina A (Sigma), para detener el tráfico de proteínas intracelular. Se adicionaron además, 10 μl de forbol 12-miristato, 13-acetato y 5 μl de ionomicina (Sigma) que aumentan la permeabilidad a Ca^{2+} en las células de los grupos experimentales. Se aumentó la permeabilidad de la membrana celular de todas las células mediante la incubación con 1.5 ml de saponina (Sigma), 0.1%, albúmina sérica de bovino (Sigma) ,10%, HEPES 0.01 M (Sigma) y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de IgG de cerdo disuelto en 100 ml de PBS durante 10 min agitando suavemente a temperatura ambiente. Después se incubaron las células con 1 μl de anticuerpo primario contra la Cav-1 (BD Biosciences Pharmingen) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez terminada la incubación, las células se lavaron con 1.5 ml de solución saponina, y 0.1%, HEPES 0.1 M disuelto en 300 ml de PBS. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 min con 1 μl de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC (BD Biosciences Pharmingen), en las condiciones ya mencionadas. Se lavaron de nuevo con 1.5 ml de solución de saponina 0.1%, HEPES 0.1 M disuelto en 300 ml de PBS. Por último, se fijaron con formaldehído al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo (Becton & Dickinson, modelo FACScalibur).

Inmunohistoquímica

Se tomaron muestras de pulmón caudal izquierdo (estructura elegida de manera arbitraria) para fijarse en formaldehído al 10% y posteriormente se incluyeron fragmentos sagitales en parafina para analizarlas posteriormente. Secciones de 3 μm se desparafinaron a 55°C por 30 min y se incubaron con la tinción tricrómica de Masson.

Para la inmunohistoquímica el tejido se rehidrató mediante lavados con xileno alcohol etílico (Mallinckrodt chemicals), etanol 96%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 25% y finalmente con agua destilada (cada paso por 10 min). Una vez hidratado el tejido se realizó un lavado de las laminillas en una jarra coplin con TBST (composición: 100 ml de NaCl 3 M, 50 ml de TRIS 1 M, 1ml de Tween 20 aforado a 1 litro de agua desionizada). La recuperación antigénica se hizo con una

solución amortiguadora de citratos 10 mM a pH6, las laminillas se sumergieron y calentaron en esta solución por 5 min en un horno de microondas convencional. Cuando éstas se enfriaron realizamos el bloqueo de peroxidasa endógena mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Posteriormente se lavaron con TBST por 5 min, y se incubaron con el suero de caballo al 2% (Vector) durante 30 min, bloqueando así los sitios de reacción inespecífica. Para las muestras experimentales se quitó el suero bloqueador de caballo mediante lavados con agua desionizada y se adicionó el anticuerpo primario anti-Cav-1 (BD Biosciences Pharmingen) con la dilución 1:200 por 12 horas. Para detectar la unión del anticuerpo primario se utilizó el Kit Universal R.T.U. Vectastain (Vector laboratorios), los tejidos fueron incubados con el anticuerpo secundario biotilado y un complejo peroxidasa/streptoavidina por 30 min.

Las laminillas se lavaron con TBST dos veces por 5 minutos entre cada proceso. Finalmente, la inmunodetección se reveló mediante el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina DAB (BioRad).

Western Blot

Después de disecar el MLVA se sometió a ultrasonido por 3 min a 4 megahertz evitando el calentamiento de la muestra, en una solución de lisis celular (BioRad). Se realizó una cuantificación proteica mediante los reactivos del Kit BC BioRad assay y 30 µg de proteína fueron aplicados en un gel de poliacrilamida SDS al 10%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (BioRad). El bloqueo de sitios inespecíficos fue hecho mediante la incubación de las membranas con albúmina sérica bovina 3% con TBS-Tween (0.1 M Tris-Base, 0.5 M de NaCl y 1% de Tween 20), durante 4 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas con TBS-Tween 1% para incubar el anticuerpo primario monoclonal anti-Cav-1 (BD Biosciences Pharmingen) con la dilución 1:1000, durante 12 h. Las membranas fueron nuevamente lavadas con TBS-Tween 1% e incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (MP Biomedicals) por 1 h a temperatura ambiente. Como control de "carga" fue utilizado un anticuerpo primario monoclonal contra GADPH (Novex). Finalmente se lavó la membrana para proceder con el revelado por quimioluminiscencia. Primero fue adicionando el sustrato de la peroxidasa (20X LumiGLO® Reagent y 20X Peroxide; Cell

Signaling) y posteriormente las membranas fueron expuestas a una placa Amersham Hyperfilm (GE Healthcare).

Hemodinamia

Los animales se prepararon con 12 h de ayuno para sólidos y 4 h para líquidos. Todos los cobayos fueron sometidos a anestesia general con isofluorano (Sofloran, SA de CV). Para la inducción, los animales se colocaron en una caja que estaba conectada al vaporizador (Isotec 3 Ohmeda) el cual suministró el gas, que fue administrado hasta que los animales alcanzaron el plano quirúrgico. Después se conectaron a un monitor de signos vitales (Datascop Passport) para el registro de su electrocardiograma, posteriormente se realizó una incisión en la línea media del cuello hasta llegar a la tráquea, la cual fue disecada en toda su circunferencia y referida con una sutura de seda de 2-0 (Silk, Ethicon). Inmediatamente se realizó una incisión horizontal a nivel del quinto anillo traqueal y se introdujo una cánula orotraqueal sin globo del número 3, la cual fue fijada con la seda al tejido traqueal, conectada a un ventilador de volumen (Harvard, Rodent Modelo Ventilator 683) y al vaporizador. Todos los animales fueron ventilados con 5 ml de aire por Kg de peso y la anestesia se mantuvo con isofluorano al 1.5%.

Colocación de catéteres

Una vez que el animal se encontraba conectado al ventilador, a través de la misma incisión realizada en el cuello, se disecó la arteria carótida derecha y se le introdujo un catéter de 3 Fr (Arrow) umbilical, éste se conectó al monitor de signos vitales para el registro de la presión sistémica. Presión arterial sistólica y presión arterial diastólica que en promedio, dieron el valor de la presión arterial sistémica (PAS).

Para el registro de las presiones de la arteria pulmonar (PAP) se llevó a cabo una esternotomía media, para lo cual se colocó un blefaróstato para exponer ambos hemitórax, posteriormente se disecó toda la circunferencia del tronco de la arteria pulmonar y se le colocó

una sutura de referencia. Inmediatamente después se puso una jareta en el ventrículo derecho y en medio de ésta mediante punción, se insertó otro catéter umbilical que fue conectado al monitor de signos vitales y se registró la presión de la arteria pulmonar. Presión arterial pulmonar sistólica y presión arterial pulmonar diastólica que en promedio, dan como resultado la PAP.

RESULTADOS

Broncoobstrucción inducida por el alérgeno en el modelo de asma alérgica

El reto con OVA en los cobayos sensibilizados (Fig. 4A) indujo un incremento transitorio y significativo del \dot{V}_B ($P < 0.01$) y la respuesta máxima del \dot{V}_B no fue diferente en los siguientes retos (Fig. 4B). En los animales controles la administración de SSF no indujo cambios en el \dot{V}_B .

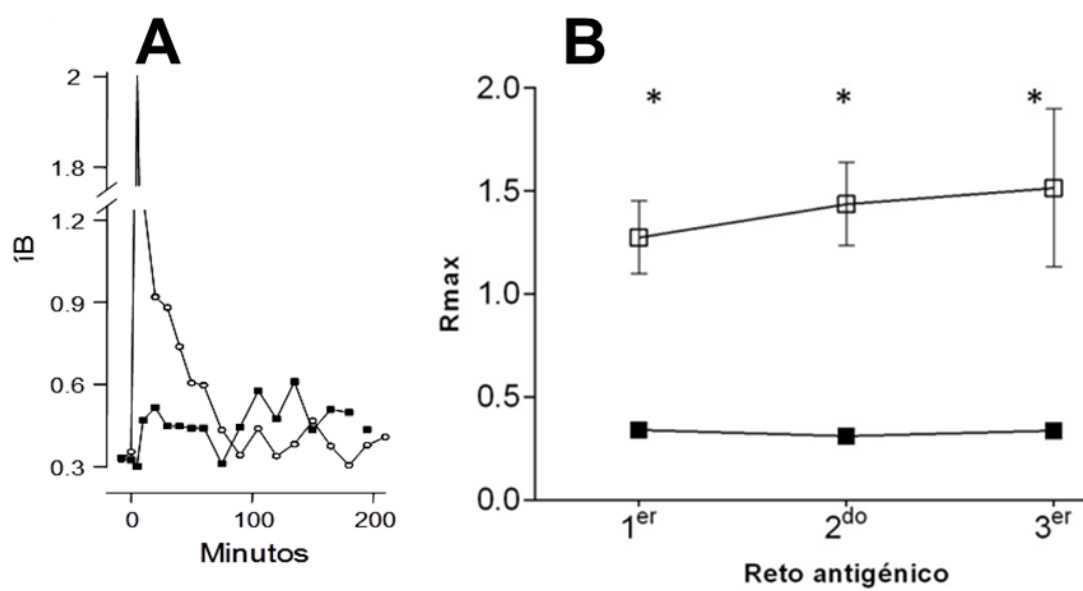


Figura 4. Broncoobstrucción inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados. A) Registro representativo de la respuesta al reto con OVA en los cobayos sensibilizados (cuadros blancos) y en los controles (cuadros negros). B) Respuesta \dot{V}_B máxima promedio (R_{max}) inducida por los retos con OVA en cobayos sensibilizados (cuadros blancos) y SSF en los controles (cuadros negros). Las líneas que salen de los cuadros representan el promedio \pm error estándar, $n = 12$ y 8 modelo de asma y control respectivamente. * $P < 0.01$, ANOVA de dos vías y prueba Post-Hoc de Bonferroni.

Reactividad de las vías aéreas

La PD_{200} , es decir, aquella dosis que hizo triplicar el valor basal del \dot{V}_B , fue diferente para el grupo control y en comparación al del grupo sometido al modelo de asma. La relación PD_{200} antes y después del reto, que representa el grado de reactividad de las vías aéreas, mostró un PD_{200} post-reto menor al PD_{200} basal, por lo que el grado de reactividad fue mayor (HVA) y significativamente diferente ($p < 0.05$) a la del grupo control (Fig. 5). La relación para este último grupo no fue diferente, obtuvo un valor cercano a 1 (Fig. 5); es decir, los animales no sensibilizados no presentaron HVA.

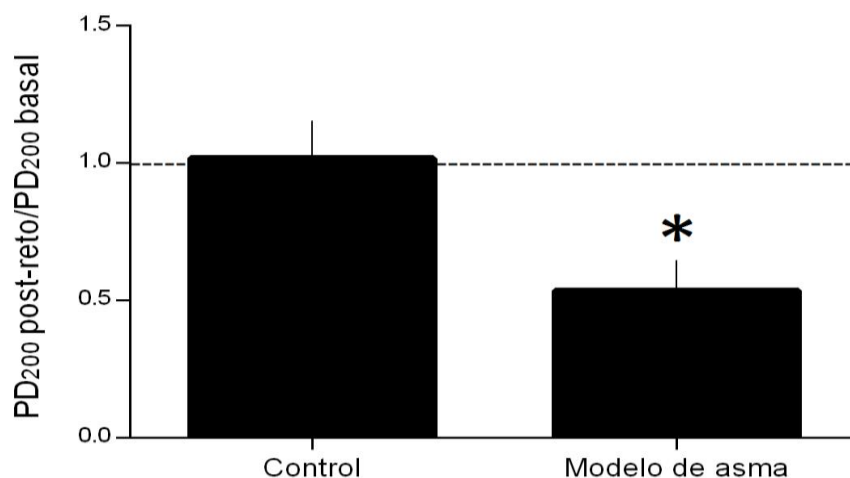


Figura 5. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica (día 35) en el cobayo. * $P < 0.05$, $n = 8$ y 12 para los grupos control y modelo de asma respectivamente; las barras representan en cociente sobre la PD_{200} antes y después del reto \pm error estándar, prueba de t de Student no pareada.

Expresión de Cav-1 en el tejido pulmonar

Una vez obtenida la muestra pulmonar de los cobayos inducidos al modelo de asma, se midió el RNA mensajero (RNAm) para Cav-1 mediante un ensayo de RT-PCR. Para evaluar si efectivamente en el macerado de pulmón había una disminución de Cav-1 como había sido reportada por Le Saux y colaboradores (2008) y por el grupo de Chen y colaboradores en 2011.

Encontramos que después del tratamiento con OVA, la cantidad del RNAm se reduce considerablemente en relación con nuestro grupo control, tomando como referencia al transcrito

de la proteína constitutiva GAPDH (Fig.6). Confirmando que la expresión de la proteína podría disminuir en el pulmón en el modelo de asma.

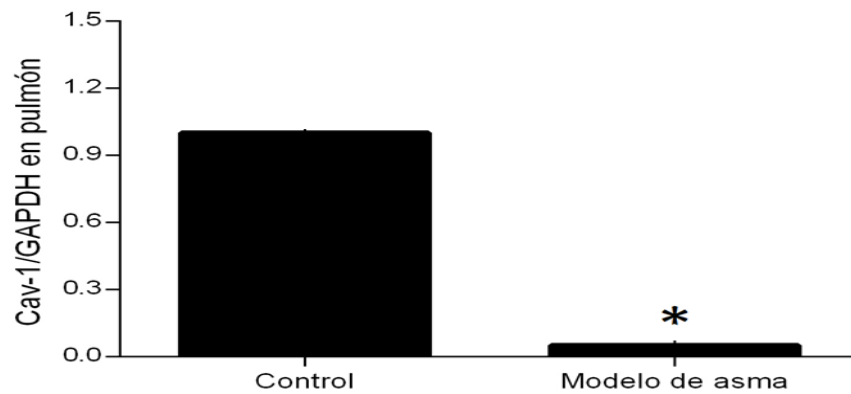


Figura 6. Niveles de RNAm (μg) para Cav-1 en pulmón de cobayo en un modelo agudo de asma alérgica. Las barras representan el cociente de la Cav-1 y el gen de GAPDH. * $P < 0.01$ prueba t de Student no pareada.

Expresión de Cav-1 en los miocitos

Al evaluar mediante citometría de flujo, la expresión de Cav-1 específicamente en los miocitos disgregados de la vía aérea, la cantidad de células que expresaron Cav-1 en el modelo de asma fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en comparación con los del grupo control (Fig. 7).

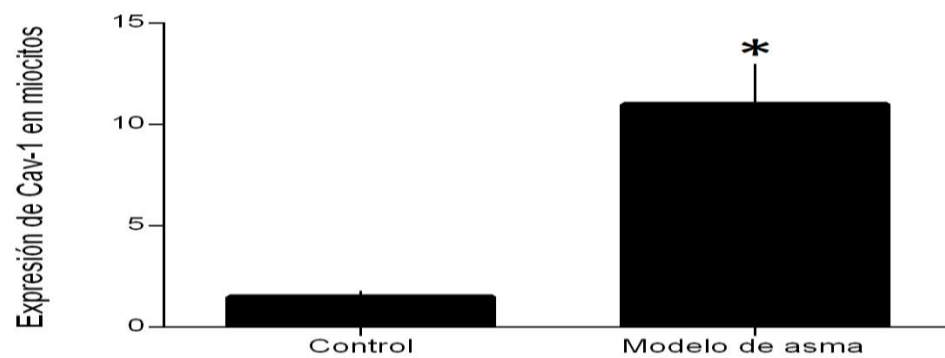


Figura 7. Porcentaje de expresión de Cav-1 en miocitos de la vía aérea en el modelo de asma alérgica en el cobayo, citometría de flujo. * $P < 0.01$; $n = 7$ y 6 respectivamente en modelo de asma y en animales control. Las barras son promedios \pm error estándar, prueba de t de Student no pareada.

Como también puede observarse en el Western Blot (Fig. 8), no existe una disminución en los animales sometidos al modelo de asma, en comparación con los del grupo control.

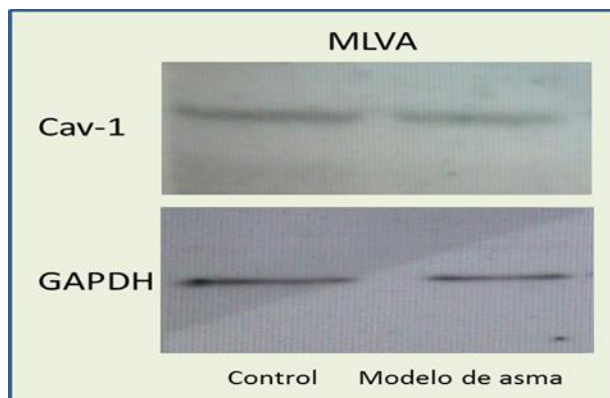


Figura 8. Expresión de Cav-1 en MLVA. Imagen representativa de 4 ensayos para modelo de asma y 3 para el grupo control.

El aumento de la expresión de Cav-1 en el MLVA, detectado por citometría, lo relacionamos con los fenómenos de obstrucción e HVA que presenta nuestro modelo de asma, cuya variable podría tener un impacto fisiológico, mediante un coeficiente de correlación.

Relación entre las variables fisiológicas y la cantidad de miocitos que expresan Cav-1

Los coeficientes de correlación de Spearman entre la respuesta obstructiva de las vías aéreas o R_{max} fue **0.691*** y para la magnitud de HVA obtuvo el valor de **-0.517***, lo cual fue estadísticamente significativo ($*P < 0.05$, $n = 15$), ambos en relación con la expresión de Cav-1 en los miocitos traqueales. El valor negativo implica una correlación directa con la HVA, debido a que los valores de ésta son obtenidos mediante un cociente (PD_{200} Post-reto/ PD_{200} Basal), para la respuesta obstructiva la correlación es también directa.

La correlación de ambos fenómenos con la presencia de Cav-1 es notable, de acuerdo con el coeficiente de correlación, lo que sugiere una participación importante de Cav-1 en el MLVA

para el desarrollo de los mismos. No obstante, esto ocurre específicamente con esta estructura, mientras que para el tejido pulmonar total, la disminución referida de Cav-1 es aún incierta.

Expresión de Cav-1 en el tejido pulmonar

En la figura 9 se presenta la distribución heterogénea de Cav-1 en el tejido pulmonar que parece disminuir drásticamente en la musculatura vascular pulmonar en los animales sometidos al modelo de asma. Mientras que el aumento en la expresión de Cav-1 en miocitos de la vía aérea, detectada por la citometría de flujo (Fig. 7), no se distingue claramente por inmunohistoquímica.

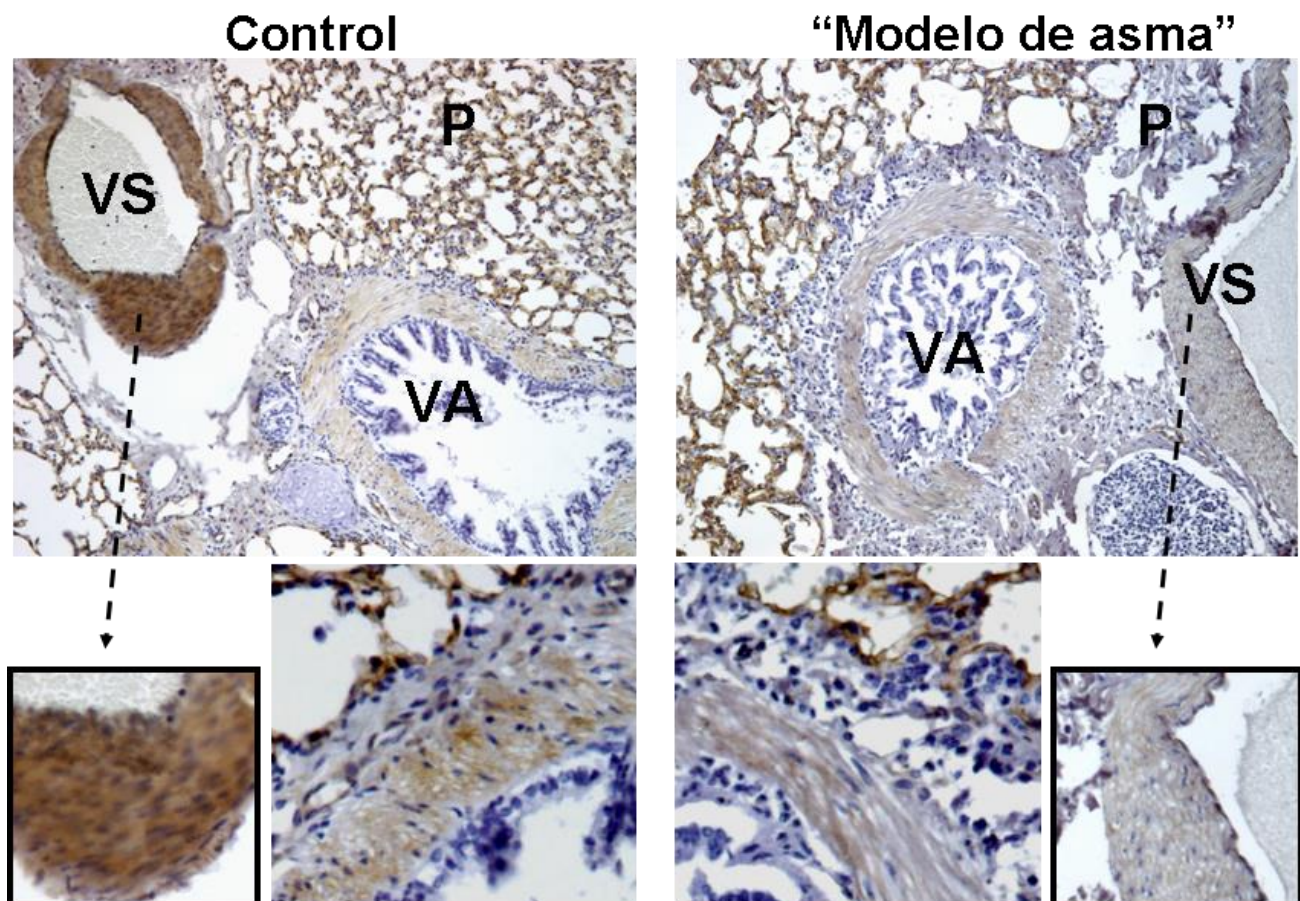


Figura 9. Expresión de caveolina-1 en tejido pulmonar. La micrografía muestra la distribución heterogénea de caveolina-1 (marca en color café), entre un animal sometido al modelo agudo de asma y otro control ($n=4$ y 2 respectivamente). Panel superior muestra una micrografía panorámica 10X del tejido

pulmonar con sus estructuras: parénquima (P), vía aérea (VA) y vaso sanguíneo (VS). En el panel inferior se presenta una comparación de la VA (centro) y de VS señalados por las flechas punteadas (a los costados).

Esta disminución en la marca de Cav-1 en el músculo liso vascular, enfocó nuestras observaciones hacia las arteriolas pulmonares, que presentaron un incremento notable en la masa del músculo liso. Situación aún más evidente conforme avanza el tiempo de exposición al alérgeno (Fig. 10).

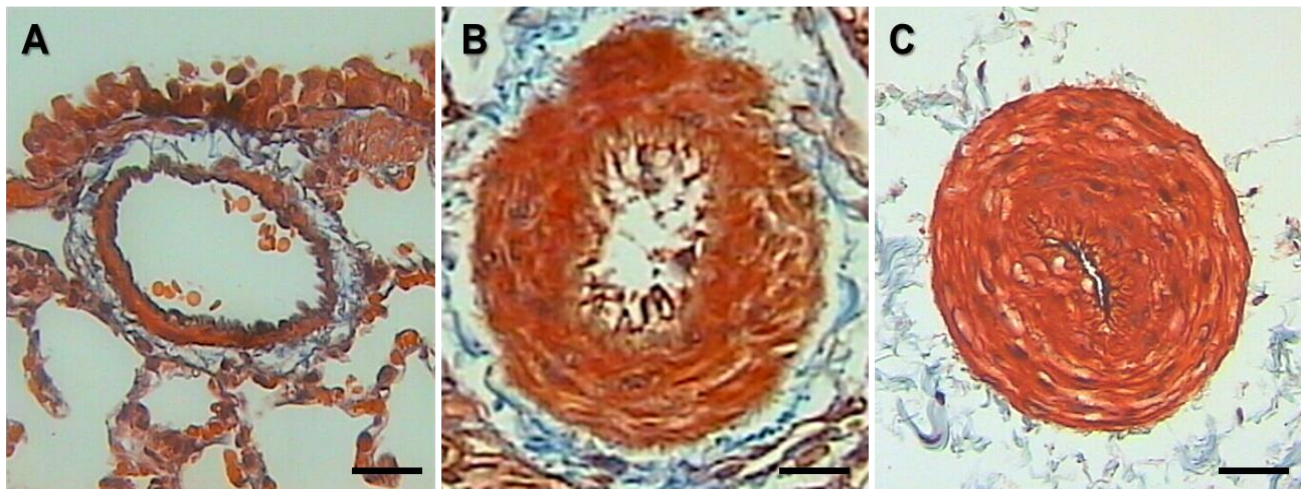


Figura 10. Efectos de la exposición a OVA en las arteriolas pulmonares de cobayos sensibilizados, Tinción tricrómica de Masson. A) grupo control, B) modelo agudo de reto día 35, C) modelo crónico de reto día 65. La escala de la barra corresponde a 30 µm.

Para evaluar si existía un estado fisiopatológico en la vasculatura, asociado a la disminución de la proteína mencionada, procedimos a medir la presión arterial sistémica (PAS) y la presión arterial pulmonar (PAP) de nuestros grupos de animales.

La PAS del grupo experimental agudo, no presentó cambio en respuesta al tratamiento administrado en relación con los animales del grupo control. Al no encontrar anomalía, también medimos esta presión en un grupo experimental crónico, para descartar la cuestión del tiempo como variable en la exposición al alérgeno en el desarrollo de hipertensión.

Como indica la figura 11A, no existe alteración en la PAS no obstante, la disminución de Cav-1 y el incremento de la masa del músculo liso, fue encontrada en la vasculatura pulmonar, en virtud de esto y debido a su importancia para mantener la homeostasis celular, procedimos a medir la PAP, en nuestros animales sometidos al modelo de asma (en agudo y en crónico), comparando con el grupo control (Fig. 11B).

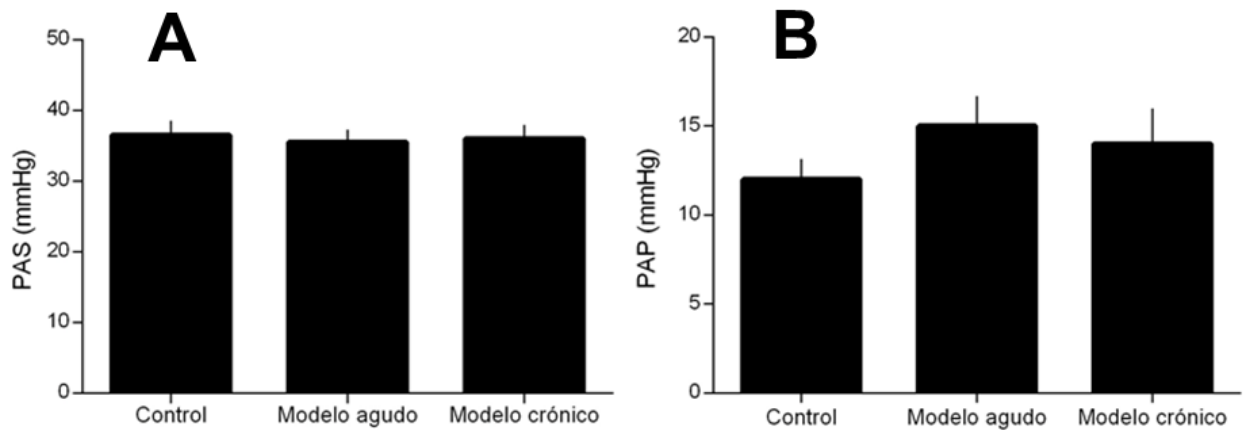


Figura 11. Presión arterial sistémica y pulmonar. A) Se muestran los valores de presión, obtenidos tras la canulación de la arteria carótida derecha de los cobayos. B) Se muestran los valores de presión, obtenidos tras la canulación de la arteria pulmonar de cobayos ($n=3$ para cada grupo). Las barras representan los promedios \pm error estándar.

Al evaluar la presión de la arteria pulmonar en los cobayos sometidos a este estudio, se pudo observar que tanto el grupo control, como los grupos experimentales, se encuentran dentro de los parámetros normales (Headley, 2002).

DISCUSIÓN

En este modelo de asma alérgica en el cobayo el desarrollo de obstrucción e HVA a la histamina son inducidos por el alérgeno, y ambos procesos fisiopatológicos se asociaron significativamente con la expresión de Cav-1 en miocitos traqueales. Esto sugiere que la Cav-1 tiene un papel importante en la fisiopatología del asma.

Cav-1 es una proteína que tiene la función de hacer eficiente la señalización para el mecanismo de contracción debido a los dominios que le permiten anclar proteínas involucradas en este proceso; por ejemplo, la presencia de canales de Ca^{2+} tipo L, canales de Ca^{2+} operados por almacén, la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, receptores para agonistas como los muscarínicos M3, los de bradicinina, y los H1 de histamina, así como de proteínas que unen Ca^{2+} , como calsecuestrina y calreticulina (Darby *et al*, 2000; Prakash *et al*, 2007). Aunque se ignoran los mecanismos precisos que inducen HVA, se sabe que la remodelación y la inflamación podrían estar asociados (Bazán-Perkins *et al*, 2009). Nuestros datos indican que es probable que un mecanismo de remodelación asociado a los cambios fenotípicos del músculo liso como la alta expresión de Cav-1 pueda contribuir a la HVA durante el desarrollo de asma.

Un dato controversial observado en el presente estudio es la baja expresión de Cav-1 en el pulmón, en comparación con el incremento en la expresión de Cav-1 que observamos en el MLVA. Es probable que se deba a una regulación a la baja de la proteína pero sólo en estructuras vasculares, situación que no ha sido descrita previamente asociada con modelos de asma en animales. En este sentido, las observaciones de Tourkina y Hoffman (2012) muestran que la baja expresión de Cav-1 en el pulmón se relaciona con fibrosis por su importante regulación en distintas vías de señalización, o bien la regulación a la baja de Cav-1 provocada por el factor β de crecimiento transformante, afectando a monocitos y fibroblastos, teniendo como resultado un proceso fibrótico (Del Galdo *et al*, 2008; Tourkina *et al*, 2010; Wang, 2006).

Por otro lado, la Cav-1 está involucrada en la quiescencia del músculo liso, pues su alta expresión inhibe la proliferación (Gosens *et al*, 2006). Si la proteína es regulada a la baja, este control se puede perder y el músculo liso vascular podría presentar un engrosamiento eventualmente, debido a la hiperplasia e hipertrofia (Fig.10), cuyo dato ha sido observado y publicado por nuestro grupo de trabajo (Moreno-Álvarez *et al*, 2010), donde la pared de

estructuras vasculares del pulmón como la arteriola, de animales sometidos a nuestro modelo crónico de asma, aumentó su espesor de forma considerable. Se sabe que el engrosamiento de las paredes vasculares se asocia con la hipertensión (Headley, 2002; Barst, 2004). Además, el músculo liso vascular presenta un mecanismo contráctil similar al MLVA, aunque se ve expuesto a distintos mediadores, no obstante la presencia de Cav-1 es también indispensable en la homeostasis de esta estructura. Perez-Zoghbi y Sanderson en 2007, describen que ligandos como acetilcolina, serotonina y endotelina, generan contracción no sólo en el MLVA, sino también en las arteriolas pulmonares, situación que podría ser clave en la modificación de la presión sistémica y pulmonar de los individuos con el padecimiento asmático.

La presión sistémica y pulmonar son un conjunto de datos que nos pueden reflejar de manera diagnóstica el funcionamiento del sistema cardiorrespiratorio. Las presiones normales oscilan entre los siguientes valores: Presión arterial sistólica pulmonar de 15 a 25 mmHg; para la presión arterial diastólica pulmonar de 8 a 15 mmHg; en promedio generando una PAP de 10 a 20 mmHg (Headley, 2002). Aunque estos valores para el cobayo pueden ser variables. La hipertensión arterial pulmonar es definida por tener un valor de PAP más elevado de 25 mmHg en estado de reposo y mayor a 30 mmHg durante alguna actividad. Se caracteriza por una progresiva y sostenida resistencia pulmonar, llevando a la hipertrofia y disfunción del ventrículo derecho, lo que lleva a la falla del corazón y hasta la muerte (Barst, 2004). No obstante, cuando evaluamos la presión arterial pulmonar y sistémica en el modelo de asma no observamos ningún cambio. Al principio supusimos que el tiempo de exposición al alérgeno del modelo agudo fue insuficiente para desarrollar hipertensión en la arteria pulmonar y que tal vez, de existir la hipertensión arterial pulmonar, fuera encontrada en un modelo crónico; sin embargo, aunque incrementamos el número de retos, no encontramos este fenómeno fisiopatológico. Es probable que exista algún mecanismo de compensación que evite el desarrollo de hipertensión.

Se ha descrito que la hipertensión pulmonar es generada por una oclusión en las arterias, cuyo epitelio y musculatura están engrosados, resultando en una obstrucción que aumenta la resistencia al flujo sanguíneo pulmonar (Dorfmueller *et al*, 2003; Smith *et al*, 1990). El proceso es atribuido a una disregulación en la hiper-proliferación del endotelio, en respuesta a diversos factores (Sakao *et al*, 2009), uno de ellos es por la disminución en la expresión de Cav-1 en este tipo celular, llevando a un aumento en la expresión de Cav-1 en el músculo liso vascular; lo que finalmente concluye en el desarrollo de hipertensión pulmonar (Huang *et al*, 2012). Sin embargo,

en nuestro modelo la disminución es encontrada específicamente en el músculo liso vascular, sobre el endotelio vascular pulmonar no sabemos si resulta afectado en alguna forma.

Cav-1 también es un inhibidor natural de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) al incorporarla a su dominio de andamiaje “Caveolin Scaffolding Domain” (CSD). La eNOS es una enzima cuya función es generar óxido nítrico, que relaja de forma parácrina al músculo liso vascular (Rath *et al*; 2009). Al generarse o inducirse una regulación a la alta de Cav-1, se formaría este complejo inhibitorio que evita la generación de óxido nítrico y por ende no habría una adecuada contracción del músculo liso provocando hipertensión. En el caso contrario podemos decir que si hay una baja expresión de Cav-1, la eNOS podría actuar libremente y por ello la musculatura vascular lisa estaría mayormente relajada (GINA, 2012; Rath *et al*, 2009; Taggart *et al*, 2000; Trujillo *et al*, 2004) explicando la ausencia de hipertensión arterial pulmonar en nuestro modelo de asma agudo y crónico. Es necesario realizar más estudios en el músculo liso vascular, tal vez las mismas técnicas de este trabajo, para encontrar una posible causa a este fenómeno.

CONCLUSIONES

El modelo de asma alérgica en el cobayo, inducido por el alérgeno, provoca el incremento en la reactividad de la vía aérea (HVA) a la histamina, así como el aumento en la expresión de Cav-1 en el MLVA.

Aunque hay una disminución a nivel pulmón de la expresión de Cav-1 en el modelo de asma alérgica en el cobayo, esto no sucede en el MLVA, donde la Cav-1 aumenta su expresión.

El incremento de la expresión de Cav-1 en el MLVA tiene una estrecha relación con la magnitud de la HVA (-0.517*) y con los procesos obstructivos relacionados con la broncoobstrucción (0.691*), según los índices de correlación de Spearman (*P<0.05).

Paradójicamente hay una disminución de Cav-1 en el músculo liso vascular pulmonar, aunque no se encontró un desorden fisiopatológico asociado.

Con base en los experimentos concluimos que el fenotipo del MLVA asociado a la hiperreactividad de las vías aéreas, es del tipo contráctil y está presente Cav-1. Es probable que la disminución de Cav-1 en el músculo liso vascular en el modelo de asma, genere un fenotipo diferente al del MLVA, probablemente de carácter proliferativo más que contráctil.

REFERENCIAS

- **Annaïg O., Benoit A., Imane B., Pierre-Olivier G., Thomas T., Roger M. and Patrick B.** The Pivotal Role of Airway Smooth Muscle in Asthma Pathophysiology. Review Article, Journal of allergy; Vol. ID 742710, 20 pages, 2011.
- **Barnes P.J.** Pharmacology of airway smooth muscle. American journal of respiratory and critical care medicine; 158: s123-132, 1998.
- **Barst R.J., McGoon M., Torbicki A., Sitbon O., Krowka M.J., Olschewski H.** Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American college of cardiology; 43 (12 Suppl): 40S-47S, 2004.
- **Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Vargas M., Martínez E., Ramos-Ramírez P., Alvarez-Santos M., Hiriart G., Gaxiola M., Hernández-Pando R.** β 1-Integrins shedding in a guinea pig model of chronic asthma with remodelled airways. Clinical and experimental allergy; 39:740-751, 2009.
- **Bazán-Perkins B., V. M. H., Sánchez Guerrero E., Chávez J. and L.M. Montaña.** Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmographi: role of catecholamines and nitric oxide. Experimental physiology; 89: 623-628, 2004.
- **Bergdahl A., and Sward K.** Caveolae-associated signalling in smooth muscle. Canadian journal of physiology and pharmacology, 82: 289-299, 2004.
- **Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and calcium signaling. Nature; 361:315e25, 1993.
- **Black J. L. and Roth M.** Intrinsic asthma: is it intrinsic to the smooth muscle. Clinical and experimental allergy, vol. 39, no. 7, pp. 962–965, 2009.
- **Brown S.D., Calvert H.H., Fitzpatrick A.M.** Vitamin D and asthma. Dermatoendocrinol.; 4(2):137-45, 2012.

- **Buc M., Dzurilla M., Vrlik M., and Bucova M.** Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*; 57: 331-344, 2009.
- **Burri P.H.** Development and growth of the human lung. *Comprehensive physiology*; 10(Suppl):1–46, 2011.
- **Chen C.M, Wu M.Y, Chou H.C, Lang Y.D, Wang L.F.** Downregulation of caveolin-1 in a murine model of acute allergic airway disease. *Pediatrics and Neonatology*; 52(1):5-10, 2011.
- **Cockcroft D.W., and Davis B.E.** Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *The journal of allergy and clinical immunology*; 118: 551-559, quiz 560-551, 2006.
- **Darby P.J., Kwan C.Y., and Daniel E.E.** Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in $\text{Ca}^{(2+)}$ handling. *American journal of physiology*; 279: L1226-1235, 2000.
- **Dekkers B.G., Maarsingh H., Meurs H., and Gosens R.** Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proceedings of the American thoracic society*; 6: 683-692, 2009.
- **Del Galdo F., Lisanti M.P., Jimenez S.A.** Caveolin-1, transforming growth factor-beta receptor internalización, and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology*; 20: 713-9, 2008.
- **Dorfmüller P., Humbert M., Capron F., Müller K.M.** Pathology and aspects of pathogenesis in pulmonary arterial hypertension. *Sarcoidosis, vasculitis and diffuse lung diseases*; 20(1):9–19, 2003.
- **Downs S.H., Schindler C., Liu L.J., Keidel D., Bayer-Oglesby L., Brutsche M.H., Gerbase M.W., Keller R., Künzli N., Leuenberger P., Probst-Hensch N.M., Tschopp J.M., Zellweger J.P., Rochat T., Schwartz J., Ackermann-Liebrich U.** Reduced exposure to PM10 and attenuated age-related decline in lung function. *The New England journal of medicine*; 357:2338–2347, 2007.

- **EPR-3. National Asthma Education and Prevention Program.** Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.09.029>, Report 2007.
- **Fitzpatrick A.M., Teague W.G., Meyers D.A., Peters S.P., Li X., Li H.** National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Heterogeneity of severe asthma in childhood. *The journal of allergy and clinical immunology*; 127:382-9.e1, 2011.
- **GINA, The Global Burden of Asthma Report.** Página electrónica: www.ginasthma.org, 2012.
- **Gosens R., Mutawe M., Martin S., Basu S., Bos S.T., Tran T., and Halayko A.J.** Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Current molecular medicine*; 8: 741-753, 2008.
- **Gosens R., Stelmack G.L., Bos S.T., Dueck G., Mutawe M.M., Schaafsma D., Unruh H., Gerthoffer W.T., Zaagsma J., Meurs H., Halayko A.J.** Caveolin-1 is required for contractile phenotype expression by airway smooth muscle cells. *Journal of cellular and molecular medicine*; 15(11):2430-42, 2011.
- **Gosens R., Stelmack G.L., Dueck G., McNeill K.D., Yamasaki A., Gerthoffer W.T., Unruh H., Gounni A.S., Zaagsma J., and Halayko A.J.** Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *American journal of physiology*; 291: L523-534, 2006.
- **Gosens R., Stelmack G.L., Dueck G., Mutawe M.M., Hinton M., McNeill K.D., Paulson A., Dakshinamurti S., Gerthoffer W.T., Thliveris J.A., Unruh H., Zaagsma J., and Halayko A.J.** Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization and contraction in airway smooth muscle. *American journal of physiology*; 293: L1406-1418, 2007.
- **Grim K.J., Abcejo A.J., Barnes A., Sathish V., Smelter D.F., Ford G.C., Thompson M.A., Prakash Y.S., Pabelick C.M.** Caveolae and propofol effects on airway smooth muscle. *British journal of anaesthesia*; 109(3):444-53, 2012.

- **Halayko A.J., Tran T., and Gosens R.** Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proceedings of the American thoracic society*; 5: 80-88, 2008.
- **Hall I.P.** Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *The European respiratory journal*; 15:1120e7, 2000.
- **Hamelmann E., S. J., Takeda K., Oshiba A., Larsen G.L., Irvin CG. and Gelfand E.W.** Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American journal of respiratory and critical care medicine*; 156: 766-775, 1997.
- **Headley J.M.** Invasive hemodynamic monitoring: Physiological principles and clinical applications. Irvine, 2002.
- **Holgate S. T., Roberts G., Arshad H. S., Howarth P. H., Davies D. E.** The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proceedings of the American thoracic society*; vol.6, no. 8, pp. 655–659, 2009.
- **Holt P.G., Strickland D.H.** Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: new perspectives from studies on acute exacerbations. *The journal of allergy and clinical immunology*; 125:963-72, quiz 973-4, 2010.
- **Huang J., Wolk J.H. , Gewitz M.H. , Mathew R.** Caveolin-1 expression during the progression of pulmonary hypertension. *Experimental biology and medicine (Maywood)*; 1;237(8):956-65, 2012.
- **Hunter I., and Nixon G.F.** Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells. Lipid rafts are essential for TNF-alpha-mediated activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. *The journal of biological chemistry*; 281: 34705-34715, 2006.
- **KAACI, The Korean Academy of Asthma.** Allergy and Clinical Immunology. Treatment guideline of asthma in Korea; Available from: <http://www.allergy.or.kr>, 2007.
- **Kim J. S. and Rubin B. K.** Nasal and sinus inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of chronic obstructive pulmonary disease*; vol. 4, no. 2, pp. 163–166, 2007.

- **Le Saux C.J., Teeters K., Miyasato S.K., Hoffmann P.R., Bollt O., Douet V., Shohet R.V., Broide D.H., and Tam E.K.** Down-regulation of caveolin-1, an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, in acute allergen-induced airway remodeling. *The journal of biological chemistry*; 283: 5760-5768, 2008.
- **Monier S., Parton R.G., Vogel F., Behlke J., Henske A., Kurzchalia T.V.** VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Molecular biology of the cell*; 6(7): 911–927, 1995.
- **Mora R.** Caveolin-2 localizes to the Golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when coexpressed with caveolin-1. *The journal of biological chemistry*; 274(36): 25708–25717, 1999.
- **Moreno-Alvarez P., Sánchez-Guerrero E., Martínez-Cordero E., Hernández-Pando R., Campos M., Cetina L. and Bazán-Perkins B.** Aerosolized Polymerized Type I Collagen Reduces Airway Inflammation and Remodelling in a Guinea Pig Model of Allergic Asthma. *Medicine lung*; vol. 188, 97-105, 2010.
- **Nuttie L.C., Farley J.M.** Frequency modulation of acetylcholine induced oscillations in Ca²⁺ and Ca²⁺-activated Cl⁻ current by cAMP in tracheal smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 277:753e60, 1996.
- **O'Byrne.** Airway hyperresponsiveness. *Chest*; 123:411S-416S, 2003.
- **Parolini I., Sargiacomo M., Galbiati F., Rizzo G., Grignani F., Engelman J.A., Okamoto T., Ikezu T., Scherer P.E., Mora R., Rodriguez-Boulan E., Peschle C., Lisanti M.P.** Expresión of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex. *The Journal of biological chemistry*; 274(36): 25718–25725, 1999.

- **Pelaia G., Renda T., Gallelli L., Vatrella A., Buscetta M., Agati S., Caputi M., Cazzola M., Maselli R., Marsico S.** Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory medicine*; 102, 1173e1181, 2008.
- **Perez-Zoghbi J.F., Sanderson M.J.** Endothelin-induced contraction of bronchiole and pulmonary arteriole smooth muscle cells is regulated by intracellular Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} sensitization. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*; 293(4):L1000-11, 2007.
- **Peters K. R., Carley W.W., and Palade G.E.** Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. *The journal of cell biology*; 101(6):2233–2238, 1985.
- **Prakash Y.S., Thompson M.A., Vaa B., Matabdin I., Peterson T.E., He T., and Pabelick C.M.** Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *American journal of physiology*; 293: L1118-1126, 2007.
- **Rath G., Dessy C., Feron O.** Caveolae, Caveolin and control of vascular tone: Nitric oxide (NO) and Endothelium derived Hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *Journal of physiology and pharmacology*; 60, Suppl 4, 105-109, 2009.
- **Ray A., Cohn L.** Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *The journal of clinical investigation*; 104(8):985–993, 1999.
- **Sakao S., Tatsumi, K., Voelkel, N.F.** Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respiratory research*; 10:95, 2009.
- **Sathish V., Yang B., Meuchel L.W., VanOosten S.K., Ryu A.J., Thompson M.A., Prakash Y.S., Pabelick C.M.** Caveolin-1 and force regulation in porcine airway smooth muscle. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*; 300(6):L920-9, 2011.
- **Sharma P., Ghavami S., Stelmack G.L., McNeill K.D., Mutawe M.M., Klonisch T., Unruh H., Halayko A.J.** Beta-Dystroglycan binds caveolin-1 in smooth muscle: a functional role in caveolae distribution and Ca^{2+} release. *Journal of cell science*; 123 (Pt 18):3061-70, 2010.

- **Scherer P.E., Okamoto T., Chun M., Nishimoto I., Lodish H.F., Lisanti M.P.** Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 93(1): 131–135, 1996.
- **Schlenz H., Kummer W., Jositsch G., Wess J., Krasteva G.** Muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction is coupled to caveolae in murine airways. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*; 298(5):L626-36, 2010.
- **Simons K. and. Toomre D.** Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 1(1): 31–39, 2000.
- **Smith P., Heath D., Yacoub M.** The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *The journal of pathology*; 160(2):111–121, 1990.
- **Somlyo AP., Somlyo AV.** Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews*; 83:1325e58, 2003.
- **Somlyo AP., Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*; 372:231e6, 1994.
- **Taggart M.J., Leavis P., Feron O., and Morgan K.G.** Inhibition of PKC α and rhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Experimental cell research*; 258: 72-81, 2000.
- **Thirstrup S.** Control of airway smooth muscle tone. I—electrophysiology and contractile mediators. *Respiratory medicine*; 94:328e36, 2000.
- **Tourkina E., Hoffman S.** Caveolin-1 signaling in lung fibrosis. *The open rheumatology journal*; 2012;6: 116-22, 2012.
- **Tourkina E., Richard M., Oates J., Hofbauer A., Bonner M., Gööz P., Visconti R., Zhang J., Znoyko S., Hatfield C.M., Silver R.M., Hoffman S.** Caveolin-1 regulates leucocyte behaviour in fibrotic lung disease. *Annals of the rheumatic diseases*; 69: 1220-6, 2010.

- **Trompette A., Divanovic S., Visintin A., Blanchard C., Hegde R.S., Madan R., Thorne P.S., Wills-Karp M., Gioannini T.L., Weiss J.P., Karp C.L.** Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*; 457:585–588, 2009.
- **Trujillo J. Ramírez V., Pérez J., Torre-Villalvazo I., Torres N., Tovar R., Muñoz M., Uribe N., Gamba G. . Bobadilla N.** Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation. *American journal of physiology. Renal physiology*; 288:F108–F116, 2004.
- **Vargas M. H.** Fisiopatología del asma. *Neumología y cirugía de tórax*; Vol. 68(S2):S111-S115, 2009.
- **Wang W., Zhu R., Xie Q., Li A., Xiao Y., Li K., Liu H., Cui D., Chen Y., Wang S.** Enhanced bioavailability and efficiency of curcumin for the treatment of asthma by its formulation in solid lipid nanoparticles. *International journal of nanomedicine*; 7:3667-77. Epub 2012 Jul 17, 2012.
- **Wang X.M., Zhang Y., Kim H.P., Zhou Z., Feghali-Bostwick C.A., Liu F., Ifedigbo E., Xu X., Oury T.D., Kaminski N., Choi A.M.** Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The journal of experimental medicine*; 203: 2895-906, 2006.
- **Xu W., Lan Q., Chen M., Chen H., Zhu N., Zhou X., Wang J., Fan H., Yan C.S., Kuang J.L., Warburton D., Togbe D., Ryffel B., Zheng S.G., Shi W.** Adoptive transfer of induced-treg cells effectively attenuates murine airway allergic inflammation. *PLoS One*; 7(7):e40314. Epub 2012 Jul 9, 2012.
- **Yin L.M., Jiang G.H., Wang Y., Wang Y., Liu Y.Y., Jin W.R., Zhang Z., Xu Y.D., Yang Y.Q.** Serial analysis of gene expression in a rat lung model of asthma. *Respirology*; 13(7):972–982, 2008.
- **Zuyderduyn S., Sukkar M. B., Fust A., Dhaliwal S., and Burgess J. K.** Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *European respiratory journal*; vol. 32, no. 2, pp. 265–274, 2008.