



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**Expresión de las integrinas alfa-1 beta-1  
y alfa-2 beta-1 solubles en un modelo de  
asma alérgica en cobayo**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

*Bióloga*

PRESENTA:

*Diana Adixa García Trejo*

TUTORA:

*Dra. Patricia Ramos Ramírez*



MÉXICO

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.

## Hoja de datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad

### 1. Datos del alumno

García  
Trejo  
Diana Adixa

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad  
Carrera  
Número de Cuenta

Facultad de Ciencias  
Biología  
306252048

### 2. Datos del Tutor (a)

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 2. Datos del Tutor (a)

Dra.  
Patricia  
Ramos  
Ramírez

### 3. Datos del Sinodal 1

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3. Datos del Sinodal 1

Dr.  
Eduardo Alberto  
García  
Zepeda

### 4. Datos del Sinodal 2

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 4. Datos del Sinodal 2

Dra.  
María de Lourdes  
Segura  
Valdez

### 5. Datos del Sinodal 3

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5. Datos del Sinodal 3

Dra.  
Blanca Margarita  
Bazán  
Perkins

### 6. Datos del Sinodal 4

Grado  
Nombre (s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 6. Datos del Sinodal 4

M. en C.  
Georgina  
Nieto  
Castañeda

### 7. Datos del trabajo escrito

Título

### 7. Datos del trabajo escrito

Expresión de las integrinas alfa-1 beta-1 y alfa-2 beta-1 solubles en un modelo de asma alérgica en cobayo

Subtítulo  
Número de páginas  
Año

55  
2013

## **Jurado asignado**

Presidente: Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

Vocal: Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Secretario: Dra. Patricia Ramos Ramírez

Primer suplente: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Segundo suplente: M. en C. Georgina Nieto Castañeda

### **Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Hiperreactividad Bronquial  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
"Ismael Cosío Villegas"

---

#### **Asesora**

Dra. Patricia Ramos Ramírez

---

#### **Sustentante**

Diana Adixa García Trejo

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>Abreviaturas</b>                             | 1  |
| <b>Resumen</b>                                  | 3  |
| <b>1. Introducción</b>                          | 5  |
| 1.1 Vías aéreas                                 | 5  |
| 1.2 Asma  | 6  |
| 1.2.1 Clasificación                             | 7  |
| 1.3 Inflamación de las vías aéreas              | 8  |
| 1.3.1 Inflamación aguda                         | 8  |
| 1.3.1.1 Sensibilización                         | 8  |
| 1.3.1.2 Respuesta alérgica inmediata o temprana | 9  |
| 1.3.1.3 Respuesta alérgica tardía               | 10 |
| 1.3.2 Inflamación crónica                       | 10 |
| 1.4 Hiperreactividad                            | 11 |
| 1.5 Bronco-obstrucción                          | 11 |
| 1.6 Remodelación de las vías aéreas             | 12 |
| 1.7 Integrinas estructurales, clasificación     | 13 |
| 1.8 Integrinas y su papel en el asma            | 14 |
| 1.8.1 Integrina $\alpha 1\beta 1$               | 14 |
| 1.8.2 Integrina $\alpha 2\beta 1$               | 15 |
| <b>2. Justificación</b>                         | 16 |
| <b>3. Planteamiento del problema</b>            | 17 |
| <b>4. Hipótesis</b>                             | 18 |
| <b>5. Objetivos</b>                             | 19 |
| <b>6. Material y métodos</b>                    | 20 |
| 6.1 Animales                                    | 20 |
| 6.2 Sensibilización antigénica                  | 20 |
| 6.3 Pletismografía barométrica                  | 21 |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.4. Retos antigénicos  | 23        |
| 6.5. Reactividad de las vías aéreas   | 23        |
| 6.6. Conteo total y diferencial de células infiltradas en el LBA  | 23        |
| 6.7. Histología convencional  | 24        |
| 6.8. Detección de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) en LBA y suero | 24        |
| 6.9. Detección de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en las vías aéreas mediante inmunohistoquímica                       | 25        |
| 6.10. Análisis de resultados  | 26        |
| <b>7. Resultados</b>  | <b>27</b> |
| 7.1. Obstrucción de las vías aéreas inducida por OVA en cobayos sensibilizados  | 27        |
| 7.2. Reactividad de las vías aéreas   | 28        |
| 7.3. Conteo celular total y diferencial en LBA  | 29        |
| 7.4. Cuantificación de la integrina $\alpha 1\beta 1$ en LBA y suero  | 30        |
| 7.5. Cuantificación de la integrina $\alpha 2\beta 1$ en LBA y suero  | 32        |
| 7.6. Identificación de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en tejido pulmonar  | 34        |
| 7.7. Tinción de estructuras subepiteliales mediante la técnica tricrómica de Masson   | 35        |
| <b>8. Discusión</b>   | <b>37</b> |
| <b>9. Conclusiones</b>  | <b>41</b> |
| <b>10. Bibliografía</b>   | <b>42</b> |

## ABREVIATURAS

### Abreviaturas Significado

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADAM              | Proteína desintegrina y metaloproteínasa (por sus siglas en inglés <i>A desintegrin and metalloproteinase</i> )                                   |
| APC               | Célula presentadora de antígeno (por sus siglas en inglés, <i>antigen-presenting cells</i> )  |
| ARNm              | ARN mensajero   |
| DP <sub>200</sub> | Dosis provocativa 200   |
| ELISA             | Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzima (por sus siglas en inglés, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )                                  |
| FcεRI             | Receptor de alta afinidad de inmunoglobulina E  |
| FEV <sub>1</sub>  | Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (por sus siglas en inglés <i>forced expiratory volume in the first second</i> )                  |
| íB                | Índice de bronco-obstrucción  |
| IgE               | Inmunoglobulina E   |
| IL                | Interleucina  |
| ISAAC             | Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Niñez, por sus siglas en inglés <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> |
| LBA               | Lavado bronquioalveolar   |
| MHC-II            | Complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II, por sus siglas en inglés <i>major histocompatibility complex</i> )                  |
| MMP               | Metaloproteasas de matriz (por sus siglas en inglés, <i>matrix metalloproteinases</i> )   |

|                  |  |
|------------------|--|
| NK               | Células asesinas naturales (por sus siglas en inglés, <i>natural killer</i> )      |
| nm               | Nanómetro  |
| PBS              | Solución amortiguadora de sales y fosfatos   |
| OVA              | Ovoalbúmina  |
| R <sub>máx</sub> | Respuesta máxima   |
| SS               | Sin sensibilizar   |
| SSF              | Solución salina fisiológica  |
| TCR              | Receptor de célula T (por sus siglas en inglés, <i>T cell Receptor</i> )           |
| VLA              | Antígeno de expresión tardía (por sus siglas en inglés, <i>Very Late antigen</i> ) |

## RESUMEN

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes de las vías aéreas. Se estima que entre el 5 y el 10% de los pacientes con asma desarrollan un proceso de reparación anormal, inducido por la inflamación crónica, que se denomina remodelación de las vías aéreas. La remodelación involucra cambios en la composición, organización y cantidad de los elementos que conforman a las vías aéreas. Algunos de estos cambios se han relacionado con la severidad del asma y resultan en el estrechamiento irreversible de las vías aéreas. Entre los cambios que caracterizan la remodelación de las vías aéreas se encuentran el incremento del tejido submucoso, la hipertrofia e hiperplasia de células musculares y la fibrosis subepitelial. La fibrosis subepitelial resulta de la acumulación de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágena e induce la obstrucción residual y permanente del flujo de aire, lo que repercute considerablemente en la disminución de la función pulmonar. La expresión de receptores de colágena también interviene en la síntesis de esta proteína. En el pulmón las colágenas más abundantes son I, II y III. Las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  son los principales receptores para estas colágenas. En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se encontró que la fibrosis subepitelial y la disminución en la función pulmonar estaban asociadas a la sobreexpresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en músculo liso y en la región subepitelial de las vías aéreas. La subunidad  $\beta 1$  de integrina se detectó en áreas acelulares, lo que indica que la integrina se encontraba de forma soluble. El objetivo del presente estudio fue cuantificar los dominios intracelular y extracelular de las formas solubles de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  en lavado bronquioalveolar (LBA) y suero en un modelo de asma alérgica en cobayo. Los cobayos macho de la cepa Hsd:Poc:DH fueron sensibilizados y retados a intervalos de diez días con aerosoles de con ovoalbúmina (OVA) hasta completar doce retos (n=6, cobayos del modelo de asma). Se incluyó un grupo sin sensibilizar (SS) (n=6) al que únicamente se le administraron aerosoles de solución salina fisiológica (SSF). La función pulmonar se registró mediante pletismografía barométrica durante cada reto y la hiperreactividad a la histamina fue evaluada en el doceavo reto. El número de eosinófilos y neutrófilos fue significativamente mayor en el LBA de los cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo SS. Los niveles de los dominios intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en LBA y suero no fueron diferentes entre los grupos; sin embargo, en todos los grupos se observó un incremento significativo en la expresión

del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular. Los niveles del dominio extracelular de la integrina en los cobayos del modelo de asma y los cobayos SS fueron mayores en el suero en comparación con el LBA. Los niveles de los dominios extracelular e intracelular de la integrina  $\alpha2\beta1$  fueron significativamente mayores en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos SS tanto en el LBA como en el suero. En el suero de los cobayos del modelo de asma y en los cobayos SS se observó un incremento significativo en la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular. Por otra parte, los niveles del dominio extracelular de la integrina en los cobayos del modelo de asma fueron mayores en el suero en comparación con el LBA. En las secciones de pulmón de los cobayos del modelo de asma, la integrina  $\alpha1\beta1$  se observó incrementada en el epitelio, el músculo liso, la mucosa subepitelial y en la región adventicia, mientras que la integrina  $\alpha2\beta1$  se observó principalmente en el epitelio, el músculo liso, la mucosa subepitelial y en la región adventicia. En el grupo SS la tinción para las integrinas fue escasa. Finalmente, la tinción de estructuras subepiteliales mediante la técnica Tricrómica de Masson reveló la acumulación de colágenas en la mucosa subepitelial y el engrosamiento de la capa de músculo liso en los cobayos del modelo de asma. Nuestros datos sugieren que la cuantificación del dominio extracelular de la integrina  $\alpha2\beta1$  en suero puede ser una herramienta no invasiva en el diagnóstico de la fibrosis subepitelial.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Vías aéreas.

Las vías aéreas son una serie de tubos que disminuyen su calibre a medida que se introducen en el pulmón hasta alcanzar los espacios aéreos más pequeños. La función de las vías aéreas consiste en conducir, humedecer y filtrar el aire inspirado del exterior hacia el sitio de intercambio gaseoso, los alveolos (Ross et al., 2007).

Las vías aéreas se dividen en superiores e inferiores. Las vías aéreas superiores comprenden las fosas nasales, la cavidad oral y la faringe, mientras que las vías aéreas inferiores incluyen la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. El aire ingresa a las vías aéreas superiores a través de la nariz y se dirige a la faringe y después a la tráquea que se ramifica en dos bronquios principales. A medida que los bronquios se ramifican disminuyen su calibre y la cantidad de cartílago y epitelio se reducen. Los bronquios se ramifican en múltiples bronquiolos, los cuales carecen de cartílago y contienen menos músculo liso (Silverthorn et al., 2008).

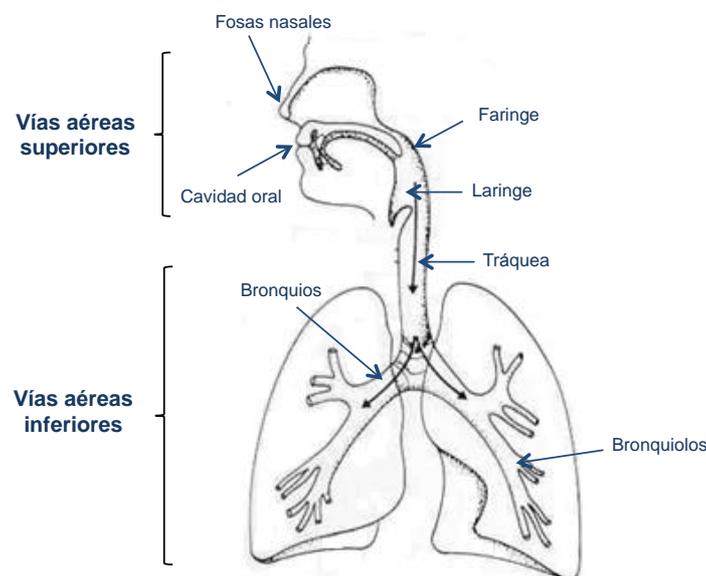
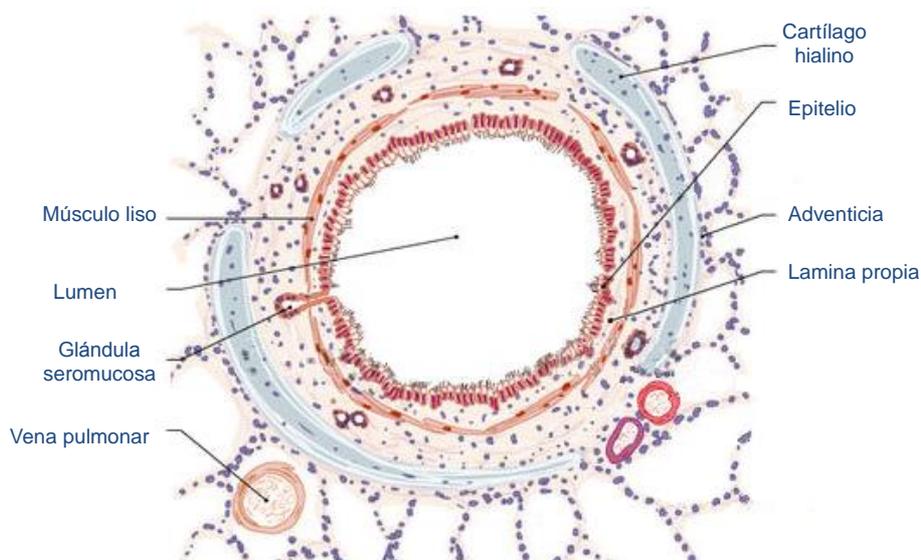


Figura 1. Estructura de las vías aéreas en humano. Modificado de Silverthorn et al., 2008.

La pared de las vías aéreas está recubierta por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado que contiene células caliciformes y células basales. Bajo el epitelio se encuentra la lámina propia formada por tejido conjuntivo y glándulas seromucosas, constituyendo a la mucosa respiratoria (Kierszenbaum, 2008; Welsch, 2009) (Fig. 2). Las vías aéreas son susceptibles a desarrollar enfermedades, una de las más frecuentes es el asma.



**Figura 2. Diagrama histológico de un bronquio.** Modificado de Kierszenbaum, 2008

## 1.2 Asma.

El asma es un desorden inflamatorio crónico caracterizado por el estrechamiento reversible de las vías aéreas en respuesta a diversos estímulos (Kierszenbaum, 2008). La inflamación crónica induce el incremento en la reactividad de las vías aéreas y se manifiesta a través de episodios recurrentes de síntomas respiratorios como sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos. Los síntomas respiratorios están asociados a la obstrucción extensa y variable del flujo aéreo pulmonar que a menudo es reversible de manera espontánea o con tratamiento (Huerta, 2009; GINA, 2012).

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes a nivel mundial y se estima que 300 millones de personas la padecen (GINA, 2012). La prevalencia de asma a nivel mundial varía mucho. Se estima que la menor prevalencia es del 2%

mientras que en ciertos lugares alcanza hasta el 25% según el estudio internacional sobre asma y alergias en la niñez (ISAAC, por sus siglas en inglés, *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*). En México la prevalencia de asma oscila entre el 5 y el 12% (Vargas-Becerra, 2009; Huerta et al., 2009). En el 2011 el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) reportó que el asma fue la principal causa de atención en los servicios de urgencias y de hospitalización (Informe Anual de Labores INER, 2011). Adicionalmente, se ha considerado que a nivel mundial el asma es la principal causa de ausentismo escolar y laboral (Goldsby, 2006), por lo que representa un problema de salud pública y junto a su naturaleza crónica genera un alto impacto económico y social (GINA, 2012).

Los factores que influyen en el riesgo de desarrollar asma se dividen en factores asociados al huésped y en factores ambientales (Harver et al., 2010). Entre los factores asociados al huésped se encuentra la predisposición genética. Por ejemplo, más de 120 genes están implicados en la patogénesis del asma. Algunos de estos genes predisponen al incremento en los niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica para antígenos inocuos del medio ambiente, o alérgenos, fenómeno conocido como atopia (Des et al, 1993; Bousquet et al, 2000). Otros genes predisponen a la generación de mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción de las vías aéreas (Huerta, 2009; GINA, 2012). Entre los factores ambientales que favorecen el desarrollo de asma se encuentran los alérgenos de animales y esporas de hongos, la contaminación y la dieta. Ambos factores, genéticos y ambientales interactúan para determinar la propensión a desarrollar asma (García-Marcos, 2004; GINA, 2012).

### **1.2.1. Clasificación.**

Diversos criterios han sido establecidos para agrupar a los pacientes con asma. De acuerdo a la frecuencia de los síntomas, el asma se ha clasificado en episódica, persistente, estacional y nocturna o matutina. La clasificación según la severidad de la enfermedad combina la frecuencia de los síntomas respiratorios, la limitación del flujo de aire y la disminución de la función pulmonar, por lo que el asma se ha clasificado en intermitente, leve persistente, moderada persistente y severa persistente (Graham et al, 2006; Salas et al, 2009). De acuerdo a su etiología, el

asma se ha clasificado en extrínseca o alérgica e intrínseca o no alérgica (Vargas-Becerra, 2005). El asma extrínseca o alérgica es una reacción de hipersensibilidad de tipo I que se desencadena por la exposición a alérgenos. El asma intrínseca generalmente aparece en la edad adulta y el mecanismo desencadenante no es alérgico (De Zubiría et al., 2003; Carrillo et al, 2006). Entre los estímulos que desencadenan los episodios de bronco-obstrucción se encuentran los fármacos, el ejercicio o factores emocionales. Estas dos formas de asma son clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similares, por ejemplo, en ambos tipos de asma existe una infiltración de linfocitos T cooperadores de la clase 2 (Th2) y eosinófilos en la mucosa respiratoria (Pico-Bergantiños et al, 1999).

### **1.3 Inflamación de las vías aéreas.**

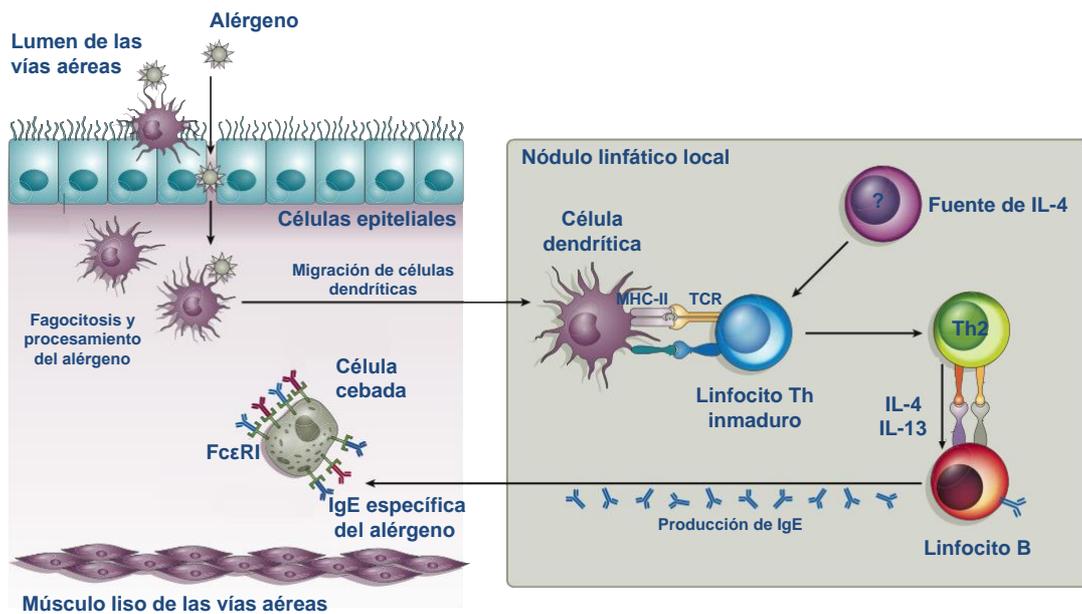
La inflamación es una respuesta compleja de un tejido dañado que involucra el reclutamiento y la activación de células encargadas de eliminar agentes infecciosos y restaurar la estructura y función (Muller, 2002). Las principales células infiltradas en las vías aéreas de los pacientes con asma incluyen eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células mononucleares. Los mediadores inflamatorios, así como los neurotransmisores secretados por las células inflamatorias producen múltiples efectos como bronco-obstrucción, exudación de plasma, hipersecreción de moco y cambios en la estructura de las vías aéreas (Carrillo, et al 2006).

#### **1.3.1 Inflamación aguda.**

##### **1.3.1.1 Sensibilización.**

El proceso de sensibilización ocurre cuando el alérgeno es captado en las vías aéreas por células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés, *antigen-presenting cell*), particularmente células dendríticas y macrófagos. Las APC degradan al alérgeno y unen los péptidos al complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MCH-II, por sus siglas en inglés, *major histocompatibility complex*) (Galli et al, 2008). Posteriormente las APC migran hacia los nódulos linfáticos locales e interactúan, a través del MHC-II, con el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés, *T Cell Receptor*) cooperadores inmaduros

lo que conduce a su activación (Goldsby et al 2006; Ying et al, 2006). Una vez activado, en presencia de interleucina (IL)-4, el linfocito T se diferencia hacia un linfocito Th2 que secreta IL-4 e IL-13. Los linfocitos Th2 activan al linfocito B y promueven la producción de IgE que se fija a su receptor FcεRI sobre la superficie de células cebadas y basófilos dando lugar a la sensibilización antigénica (Bousquet et al 2000; Vargas-Becerra, 2005) (Fig. 3).



**Figura 3. Proceso de sensibilización al alérgeno en las vías aéreas.** FcεRI, receptor de IgE de alta afinidad; IgE, inmunoglobulina E; MHC-II, complejo principal de histocompatibilidad de clase II; TCR, receptor de célula; Th, linfocito T cooperador. *Modificado de Galli et al, 2008.*

### 1.3.1.2 Respuesta alérgica temprana o inmediata.

Después del proceso de sensibilización, la respuesta temprana ocurre pocos minutos después de la exposición al alérgeno. Cuando el alérgeno entra nuevamente en contacto con la mucosa traqueobronquial y es reconocido por la IgE específica sobre las células sensibilizadas estas son activadas y liberan mediadores preformados como la histamina y mediadores derivados de lípidos, como prostaglandinas y leucotrienos. Estos mediadores inducen la contracción del

músculo liso, la secreción de moco y la vasodilatación desencadenando los síntomas respiratorios (Bousquet, 2000; Galli et al, 2008; Kierszenbaum, 2008).

### **1.3.1.3 Respuesta alérgica tardía.**

La reacción de fase tardía ocurre varias horas después de la exposición al alérgeno e involucra el reclutamiento y activación de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos Th2. La expresión de moléculas de adhesión celular y la secreción de mediadores proinflamatorios por células residentes y células reclutadas hacia las vías aéreas se incrementa durante esta fase (Galli et al, 2008; Pease et al, 2011). Los linfocitos Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que promueven la producción de IgE por las células B, inducen el reclutamiento de eosinófilos y la hipersecreción de moco (Bousquet J., 2000; Kim et al, 2010).

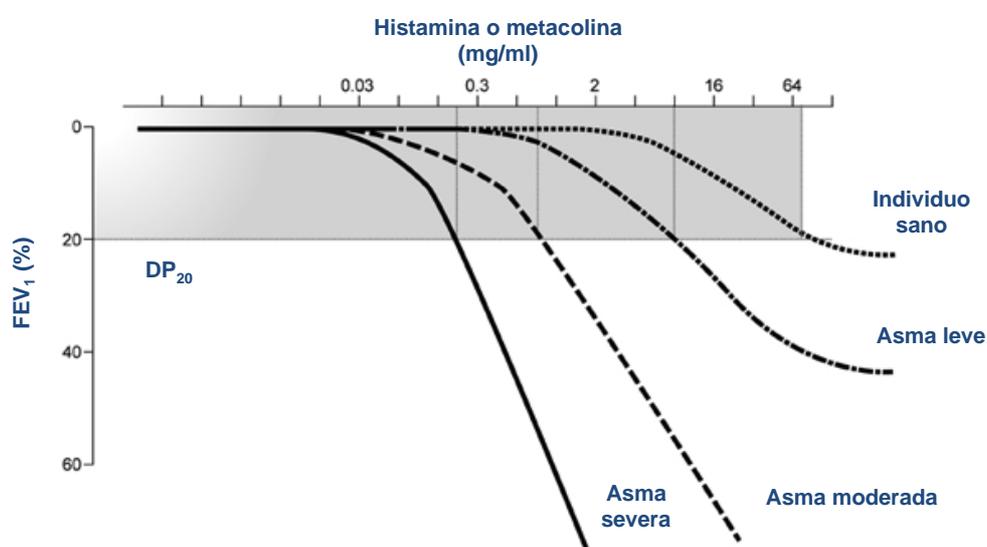
### **1.3.2. Inflamación crónica.**

La inflamación crónica es inducida por la exposición repetitiva al alérgeno y se caracteriza por la presencia de linfocitos T, eosinófilos, macrófagos/monocitos, células cebadas y neutrófilos (Bousquet et al, 2000; Bergeron et al 2010). El mantenimiento de la inflamación crónica involucra diferentes mediadores y moléculas que recluten y activen a las células inflamatorias hacia las vías aéreas (Lukacs et al, 1999;). Los mediadores inflamatorios, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, juegan un papel importante en la inflamación crónica al inducir la permeabilidad vascular y la formación de edema, mientras que mediadores como las quimiocinas y las citocinas inducen la atracción de eosinófilos y a la hipersecreción de moco. Estos mediadores también se encuentran implicados en el incremento de la reactividad de las vías aéreas (Harver et al., 2010; Bousquet, 2000).

## **1.4 Hiperreactividad.**

La hiperreactividad es la tendencia de las vías aéreas a estrecharse excesivamente ante estímulos físicos o farmacológicos que en individuos sanos tienen poco o ningún efecto (GINA, 2012). La hiperreactividad de las vías aéreas se evalúa

mediante la administración de fármacos, como la histamina o metacolina, en dosis crecientes y se mide el grado de obstrucción bronquial (Moreno-Bolton, 1995). Los resultados se expresan como la dosis provocativa 20 (DP<sub>20</sub>) que es la dosis de agonista necesaria para reducir la función pulmonar en un 20% y se expresa como el valor del FEV<sub>1</sub> (por sus siglas en inglés, *forced expiratory volume in the first second*) (Olaguibel, 2003). En individuos sanos se requiere de una dosis mayor del fármaco para inducir la disminución del 20% del FEV<sub>1</sub> en contraste con los pacientes con asma (Abraham, 2000) (Fig. 4).



**Figura 4. Gráfico representativo de una curva dosis-respuesta.** La gráfica muestra los cambios en el FEV<sub>1</sub> (Volumen Espiratorio Forzado) inducido por distintas dosis de un agonista bronco-constrictor. *Modificado de GINA, 2012.*

### 1.5 Bronco-obstrucción.

La acumulación de moco incrementa la resistencia al flujo de aire que llega a los alveólos y, aunado a la contracción del músculo, reduce el calibre de las vías aéreas. La constricción de los bronquios está controlada por los nervios parasimpáticos que actúan para proteger el tracto respiratorio inferior de sustancias inhaladas. Durante el asma alérgica las células cebadas liberan mediadores inflamatorios que inducen

la contracción del músculo liso (Silverthorn et al., 2008). Además, se incrementa la permeabilidad vascular, la liberación de mediadores inflamatorios y la secreción de moco.

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

En pacientes con asma crónica se han observado cambios en la composición, organización y cantidad de células de las vías aéreas. Este proceso se conoce como remodelación de las vías aéreas. Los cambios en la estructura de las vías aéreas se han relacionado con la severidad del asma, así como con la disminución en la función pulmonar como resultado del estrechamiento irreversible de las vías aéreas (Herrero, 2001; Bara et al, 2010). Entre el 5 y 10% de los pacientes con asma desarrollan remodelación de las vías aéreas. La remodelación es consecuencia de la inflamación crónica que al reparar de forma prolongada las vías aéreas induce la alteración de la estructura de las vías aéreas. Entre los cambios que caracterizan la remodelación se encuentra el incremento del tejido submucoso, la hipertrofia e hiperplasia de células musculares y la fibrosis subepitelial (Huerta et al, 2009; Dekkers et al, 2012).

La fibrosis subepitelial es el engrosamiento de la pared de la vías aéreas debido a la acumulación de componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena (Bazán-Perkins et al., 2009; Bazan-Socha et al 2012b). La matriz extracelular es una estructura dinámica que provee a los tejidos soporte estructural, organización y orientación. Para mantener la homeostasis es necesario que la degradación y la síntesis de los componentes de la matriz extracelular estén en equilibrio (Bousquet et al., 2000; Blumbach et al., 2012). Las metaloproteinasas degradan proteínas de la matriz extracelular y son reguladas por inhibidores específicos de metaloproteinasas (Schuliga et al., 2010). La expresión de receptores de colágena también interviene en la síntesis de esta proteína (Riikonen et al., 1995). La acumulación de colágena tipo I, II, III, IV y V tiene un efecto importante sobre la función del músculo liso de las vías aéreas y en el incremento de la hiperreactividad (Herrero, 2001; Dekkers et al, 2010). Estas colágenas forman fibras mediante sus dominios helicoidales. La colágena tipo I, no fibrilar, es la proteína más abundante en la matriz extracelular de las vías aéreas y sus principales receptores son las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 11\beta 1$  (Riikonen et al, 1995; Blumbach et al, 2012).

Las integrinas son los principales receptores involucrados en la comunicación entre célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas son receptores de diversos componentes de la matriz extracelular y regulan procesos celulares como la adhesión, la migración, la proliferación, la secreción y la diferenciación celular (Manso et al, 2006; Bazán-Perkins et al, 2012; Blumbach, 2012).

### 1.7 Integrinas estructura, clasificación.

Las integrinas son una superfamilia de proteínas que comprende receptores de superficie celular. Las integrinas son heterodímeros constituidos por las subunidades alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) que se unen de manera no covalente (Bazán et al, 2009; Heino, 2000) (Fig. 5). En mamíferos, se han descrito 18 subunidades  $\alpha$  y 8 beta  $\beta$  que pueden formar 24 distintos receptores (Plow, et al, 2000; Bengtsson et al, 2001) (Fig. 6). Las integrinas se unen a colágena mediante el dominio I de la subunidad  $\alpha$  (Jokinen et al, 2004; Emsley et al, 2012).

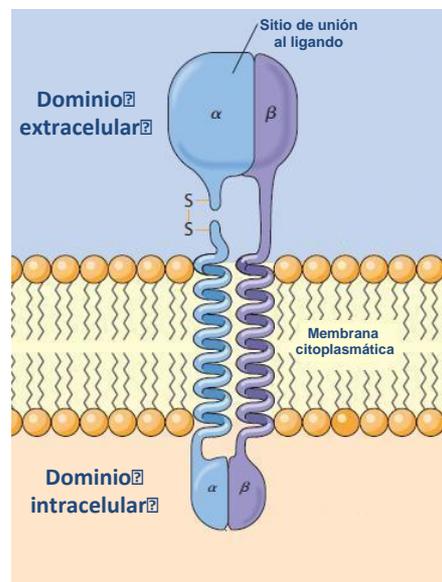
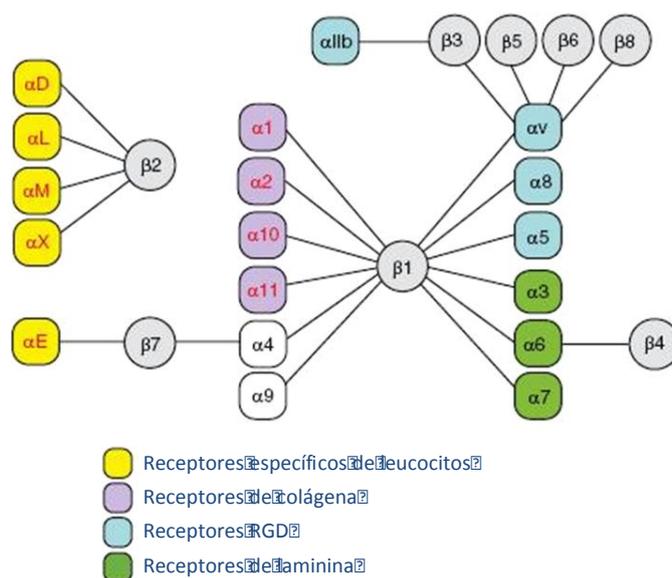


Figura 5. Estructura general de las integrinas. Modificado de Kierszenbaum, 2008.

### 1.8 Integrinas y su papel en el asma.

Las integrinas se han descrito ampliamente en enfermedades inflamatorias ya que estas moléculas de adhesión son importantes en el reclutamiento de células inflamatorias (White et al, 2004; Macías-Abraham, 2006). Particularmente, las integrinas se han asociado a la migración de eosinófilos en el pulmón (Fougerolles et al, 2000; Bathel et al, 2008). Las integrinas  $\beta 1$  se expresan en el músculo liso de las vías aéreas, así como en fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T. Las integrinas se unen a componentes de matriz extracelular como fibronectina, laminina o colágena. Los receptores para colágena son  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$  (Selistre et al., 2005; Takada et al, 2007; Srichai et al, 2010) (Fig. 6).



**Figura 6. Clasificación de la familia de las integrinas.** Modificado de Srichai et al., 2010.

### 1.8.1. Integrina $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1, CD49a/CD29)

La integrina  $\alpha 1\beta 1$  es una glicoproteína transmembranal tipo I y es uno de los principales receptores para laminina y colágena tipo I, III, IV, VI y XIII. Las colágenas más abundantes en el pulmón son las tipo I y III. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  se expresa en monocitos, macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos B y linfocitos NK (*natural killer*, por sus siglas en inglés) (Heino, 2000). Entre sus funciones se encuentra la proliferación de fibroblastos, la regulación de la síntesis de colágena y la expresión de metaloproteasas (Riikonen et al, 1995; Gardner et al 1999; Fougerolles et al,

2000). La expresión de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  no está restringida a células del sistema inmune, también se ha encontrado en células del músculo liso, fibroblastos, células mesenquimatosas y epiteliales (Bazán-Soucha et al 2012b; Abraham, 2000). Adicionalmente, la infiltración de linfocitos T que expresan  $\alpha 1\beta 1$  se ha relacionado con la contracción del músculo liso y la hiperreactividad de las vías aéreas durante el asma (Abraham, 2000; Bara et al, 2010).

### **1.9.2. Integrina $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa VLA-2)**

La integrina  $\alpha 2\beta 1$  es un receptor de colágena tipo I, III y laminina se expresa en fibroblastos, células epiteliales, células mesenquimatosas, células endoteliales, condrocitos, monocitos, queratinocitos, linfocitos, plaquetas, células cebadas, neutrófilos y eosinófilos (White et al, 2004; Blumbach et al, 2012). ITGA2 es el gen que codifica para VLA-2 (por sus siglas en inglés, *Very Late Antigen-2*). Las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  reconocen la secuencia GFOGER de colágena (Plow, et al., 2000) y a su vez juegan un papel importante en el desarrollo de fibrosis. Adicionalmente, se ha descrito que éstas proteínas estimulan la acumulación de colágena y fibronectina en las vías aéreas (Bazan-Socha et al, 2012).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El asma es una enfermedad que en las últimas décadas ha incrementado considerablemente su prevalencia en países occidentales (Kim et al, 2010; Pease et al, 2011). Se estima que entre el 5 y 10 % de los pacientes con asma desarrollan un proceso de reparación anormal de las vías aéreas denominado remodelación. La remodelación involucra cambios en la composición, organización y cantidad de los elementos que conforman a las vías aéreas. Particularmente, la fibrosis de las vías aéreas induce la obstrucción permanente del flujo de aire, lo que repercute considerablemente en la disminución de la función pulmonar (Bara et al, 2010; Schuliga, 2010). La fibrosis de las vías aéreas es el resultado del depósito excesivo de componentes de matriz extracelular, principalmente colágena. Las técnicas para diagnosticar la fibrosis generalmente son invasivas, las más utilizadas son la biopsia pulmonar y el lavado bronquioalveolar (Moore, et al 2011; Davies et al, 2003), por lo que se requiere de marcadores no invasivos para su diagnóstico. En este contexto, en estudios previos se ha descrito que la expresión de la forma soluble de la subunidad  $\beta 1$  de integrina se encuentra asociada a la fibrosis de las vías aéreas (Bazán-Perkins, 2009), por lo que la expresión de integrinas receptoras de colágena ( $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ ) en suero y lavado bronquioalveolar podría ser una herramienta no invasiva para diagnosticar la fibrosis de las vías aéreas.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se ha descrito la relación entre la fibrosis y la respuesta funcional e inflamatoria de las vías aéreas. Para ello, se ha utilizado un modelo de asma alérgica en cobayos sensibilizados y retados de manera crónica con OVA (Bazán-Perkins et al, 2009, Ramos-Ramírez, 2009). El hallazgo más significativo en estos estudios fue que el depósito excesivo de componentes de matriz extracelular, principalmente colágena, así como el incremento en la reactividad de las vías aéreas, estaban asociados a la sobre-expresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en el músculo liso y en la región subepitelial. Sorprendentemente, la subunidad  $\beta 1$  de integrina fue observada en áreas acelulares, lo que indica que la integrina se encontraba de forma soluble (Bazán-Perkins et al, 2009; Tinoco-Cuellar, 2012). Por ello, en este estudio queremos conocer si los dominios intracelular y extracelular de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ , principales receptores de colágena, pueden encontrarse de forma soluble en el suero y en el lavado bronquioalveolar de cobayos expuestos crónicamente a OVA, y de este modo, constituir un marcador diagnóstico de la fibrosis de las vías aéreas.

## 4. HIPÓTESIS

La fibrosis subepitelial es consecuencia del depósito excesivo de componentes de matriz extracelular, principalmente colágena, por lo tanto, la expresión de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  que se unen a colágena estará incrementada.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Medir la expresión de los dominios extracelular e intracelular de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  en un modelo de asma alérgica en cobayo.

### Objetivos particulares

- Cuantificar los niveles de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  en LBA y suero en un modelo de asma alérgica en cobayo.
- Detectar mediante inmunohistoquímica la expresión de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  en secciones de pulmón en un modelo de asma alérgica en cobayo.
- Comparar la expresión de los dominios extracelular e intracelular de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  en LBA y en suero de cobayos sensibilizados a ovoalbúmina.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Animales.

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa Hsd:Poc:DH, con pesos aproximados entre 350 y 450 g al inicio del protocolo. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER): 12/12 horas luz/oscuridad, aire filtrado a  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ , 50 al 60% de humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético y Científico del INER.

### 6.2 Sensibilización con OVA.

El primer día los cobayos fueron sensibilizados con OVA por vía intraperitoneal y subdérmica mediante una inyección que contenía 0.5 ml de una solución de OVA (0.06 mg/ml, Sigma, E.U.) e hidróxido de aluminio (1 mg/ml. J.T. Baker, NJ, EU) disueltos en SSF (Modificado de Campos, 2001). Se incluyó un grupo control al que únicamente se le administró SSF, este grupo fue denominado grupo sin sensibilizar (SS) (Fig. 7).

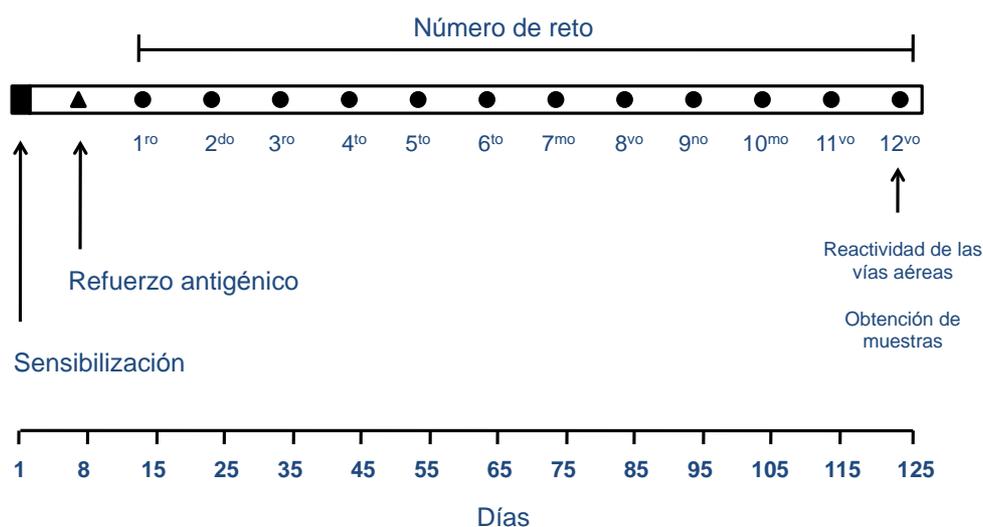
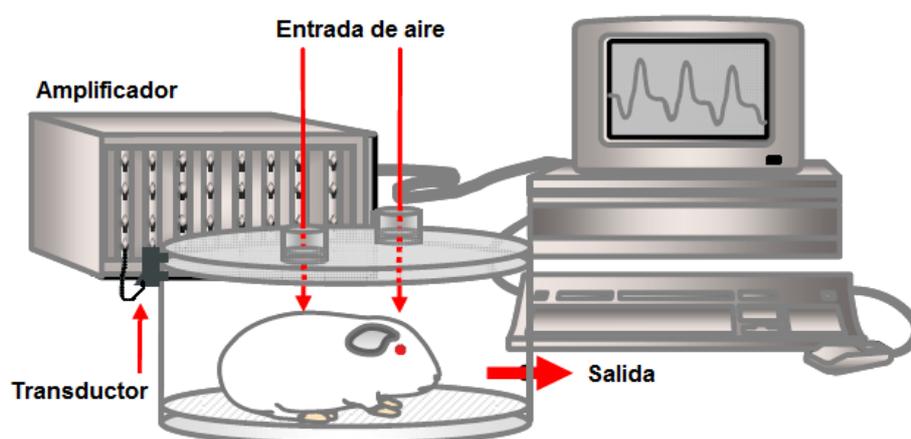


Figura 7. Esquema de sensibilización y retos antigénicos.

En el día 8 se reforzó la sensibilización en los cobayos con OVA, para esto, se les suministró aerosoles de OVA. Los cobayos fueron colocados dentro de una cámara provista de un flujo de aire continuo (10 ml/s) que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. La OVA fue nebulizada (3 mg/ml SSF) durante 5 minutos 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, el 38 de 4 a  $10\mu\text{m}$  y el 18% mayor a  $10\mu\text{m}$ . cinco minutos antes y durante una hora posterior al refuerzo antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) (Fig. 8).



**Figura 8. Esquema del equipo de pletismografía para animales en libre movimiento.** El transductor de presión diferencial registra los cambios de presión dentro de la cámara con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente a una computadora para su procesamiento.

### 6.3 Pletismografía barométrica.

El sistema de pletismografía barométrica está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia (Bazán, 2004). Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EUA), conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada por un programa (Buxco Biosistem XA v1.1) instalado en una computadora. Este

programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1ml o más, con un tiempo espiratorio de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s 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 del 7 al 10% de las respiraciones de cada período fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. El valor del índice de bronco-obstrucción (íB) fue el promedio de 15 segundos de lecturas, y de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período.

El íB refleja el grado de obstrucción de las vías aéreas y se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y del que está dentro de los pulmones del cobayo. Durante la inspiración el aire se calienta de 25° a 37°C y se humidifica al 100%. Los sensores de la cámara del pletismógrafo detectan el cambio en el volumen como un aumento en el cambio de presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio pues disminuye la presión conforme el animal exhala, el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, baja el volumen del aire dentro de la cámara y se registra como una disminución de presión. De esta manera, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa computacional, previamente calibrado, puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando las variaciones de presión durante la inspiración y espiración en el tiempo. La información es procesada por el programa para dar el valor de íB que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\text{íB} = [(T_e - T_r) / T_r] [PFE / PFI]$$

donde:

$T_e$  = tiempo total espiratorio (s)

$T_r$  = tiempo total de relajación (s)

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

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

#### **6.4 Retos antigénicos.**

Los cobayos sensibilizados fueron retados con OVA (1 mg/ml SSF) durante un minuto siguiendo el protocolo de pletismografía del día de refuerzo antigénico. Los retos posteriores se realizaron cada diez días con OVA (0.5 mg/ml SSF) hasta completar doce retos antigénicos. Los cobayos SS recibieron sólo SSF durante los retos antigénicos. Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado durante una hora.

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

La reactividad de las vías aéreas se evaluó en el grupo SS y en los grupos experimentales durante el último reto con OVA (día 125) (Fig. 7) comparando curvas dosis-respuesta a histamina inhalada antes y después de la administración de OVA. Inicialmente se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron durante un minuto dosis crecientes de histamina (0.013 a 0.32 mg/ml; Sigma, E.U.). Para cada dosis se registró el íB durante 5 minutos y se obtuvo el valor promedio. El intervalo entre cada dosis fue de 10 minutos. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una broncoobstrucción que triplicara el íB basal (dosis provocativa 200, DP<sub>200</sub>). Posteriormente se esperó a que la bronco-obstrucción disminuyera a un 50% del valor basal (Bazán, 2004) y se retó durante un minuto con aerosoles de OVA sólo a los cobayos de los grupos experimentales (0.05 mg/1 ml SSF). La segunda curva se realizó tres horas después del reto con OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva (Soomer, 2001). Los cobayos SS recibieron aerosoles de SSF.

#### **6.6 Conteo total y diferencial de células infiltradas en el LBA.**

Veinticuatro horas después de realizada la segunda curva de histamina, los animales fueron sobredosificados con un inyección vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (28 mg/kg) hasta producir un paro cardiorrespiratorio. Se realizó una incisión en la tráquea para introducir una cánula por donde se suministró dos veces SSF estéril (5 ml) a 37° C, el fluido se recuperó 1 minuto después. El número total de células en el LBA se estableció tomando 10 µl de la suspensión celular y se

colocaron en 40 µl de azul tripan al 0.4 % (Sigma, E.U.), la muestra se colocó en una cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y por el factor de la cámara (10,000) expresado como el número de células por mililitro de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener  $1 \times 10^6$  células/ml adicionando SSF y de esta solución se tomaron 50 µl que se centrifugaron a 850 rpm durante 5 minutos para obtener un botón celular que fue teñido con la técnica de Romanowsky para realizar conteo celular. La tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology Reagent ABC, E.U.) mediante la cual, se tiñen núcleos y gránulos de neutrófilos en púrpura, gránulos de eosinófilos en rosa-naranja y eritrocitos en rosa. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos con un microscopio de luz (Olympus, Japón). Posterior a la obtención del LBA, se introdujo un sistema de extracción de sangre en el ventrículo derecho (S-Monovette, Sarstedt, Alemania). La cantidad obtenida de sangre se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4°C (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania).

### **6.7 Histología convencional.**

Una vez que el suero fue obtenido se disecó el lóbulo inferior izquierdo del pulmón y se perfundió con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Science E. U.) para incluir secciones sagitales del tejido en parafina. Algunas secciones de 4 µm de grosor se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson en el laboratorio de Patología del INER. La tinción tricrómica de Masson se utiliza para diferenciar las fibras de colágena del tejido muscular. Todas las secciones teñidas fueron examinadas utilizando un microscopio de luz (Olympus, Japón).

### **6.8 Detección de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).**

Las placas de ELISA (Costar, E. U.) fueron incubadas durante toda la noche a 4° C con 50 µl del LBA o suero de los cobayos. El volumen de las placas fue decantado y los pozos fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos y carbonatos (PBS) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  88 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) y Tween 20 al

0.05% (Sigma, E.U.) (PBS-T). Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con albúmina sérica bovina fracción V al 1% en (PBS-T) por 3 horas a 37° C. Los pozos fueron incubados durante toda la noche a 4° C con los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  (hecho en cabra Santa Cruz Biotechnology, E.U.), anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio intracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  (hecho en ratón, Millipore, E.U), anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular de la Integrina  $\alpha 2\beta 1$  (anti-IgG hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology, E.U.), anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio intracelular de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (anti-IgG hecho en conejo, Millipore, E.U.) en una dilución de 1:500.

Los pozos se incubaron durante dos horas a 37 °C con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, E.U.) y durante quince minutos en una solución de ortofenildiaminobencilina (Sigma, E.U.) que contenía 0.2% de peróxido de hidrógeno (Merck KGaA, Alemania). La reacción se detuvo con 50  $\mu$ l por pozo de ácido sulfúrico 2.5 N. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector colorimétrico automatizado (LabSystems, modelo Multiskan, E.U.).

### **6.9 Detección de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en las vías aéreas mediante inmunohistoquímica.**

Se realizaron secciones de 3  $\mu$ m de grosor fijadas a laminillas de vidrio silanizadas (Sigma, E.U.) del lóbulo inferior izquierdo incluido en parafina. Los cortes de pulmón fueron desparafinados en un horno de hibridación a una temperatura de 56° C durante 30 minutos y rehidratados utilizando alcoholes graduados (Xilol 1, Xilol 2, Xilol-etanol, etanol al 100% y etanol al 90%) y agua destilada. La recuperación antigénica se realizó utilizando una solución amortiguadora de citrato de sodio (0.01 M, pH 6.0) a máxima potencia en un horno de microondas durante cinco minutos y se dejó enfriar durante 20 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 30 % (Merck KgaA, Alemania) y los sitios inespecíficos se bloquearon con suero universal de caballo (Vectastain Universal Quick Kit, VECTOR, E.U.) en PBS. Las secciones de pulmón fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  (hecho en cabra Santa Cruz Biotechnology, E.U.) y el anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular de la Integrina

$\alpha 2\beta 1$  (anti-IgG hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology, E.U.), en una dilución de 1:500 en la solución de bloqueo. La detección de la unión específica con el anticuerpo se realizó utilizando un anticuerpo secundario universal biotinilado y una solución del complejo preformado de estreptavidina-peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit, VECTOR, E.U.). Las laminillas se lavaron dos veces con PBS entre todas las incubaciones durante 5 minutos a 130 rpm. Posteriormente se utilizó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (BioRad, E.U.) como cromógeno y peróxido de hidrógeno como sustrato. La reacción se detuvo con agua corriente y las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris y finalmente se deshidrataron utilizando alcoholes graduados. Para controlar la unión inespecífica del anticuerpo, secciones de pulmón del mismo cobayo fueron incubadas en ausencia de los anticuerpos primarios y procesados de la forma descrita. Las secciones de pulmón fueron analizadas con un microscopio de campo claro (Olimpus, Provis AX-70, Japón).

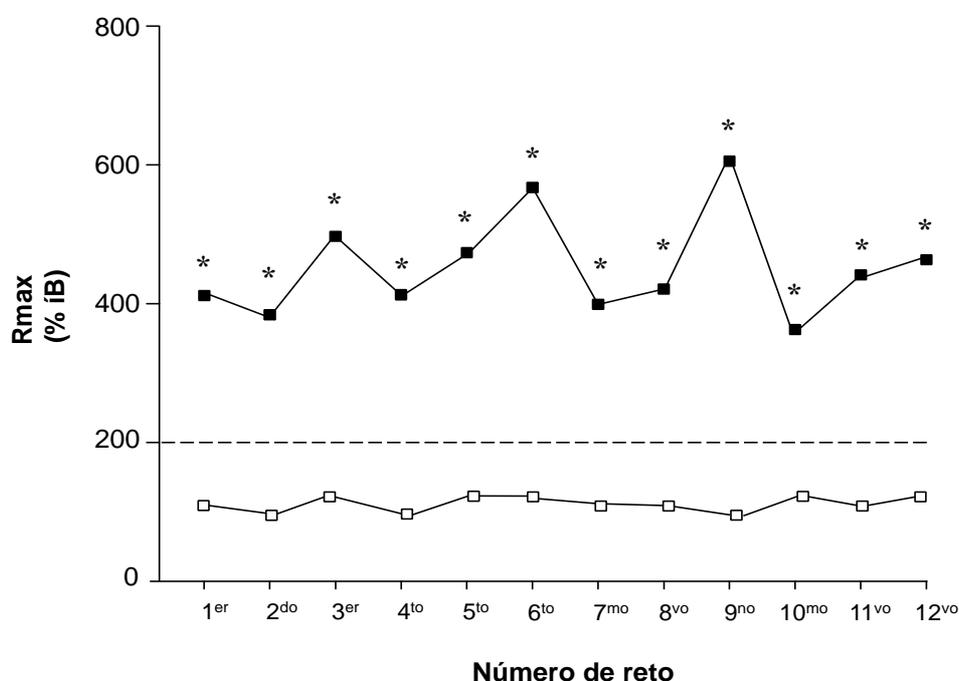
#### **6.10 Análisis estadístico.**

La reactividad de las vías aéreas a la histamina fue evaluada mediante la  $DP_{200}$ , es decir, la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el  $\dot{I}B$  basal. Las comparaciones entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba no-pareada de t de Student y la prueba pareada de t de Student. En todos los casos las significancias se establecieron con una  $p < 0.05$ . Los valores en las figuras fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Obstrucción de las vías aéreas inducida por OVA en cobayos sensibilizados.

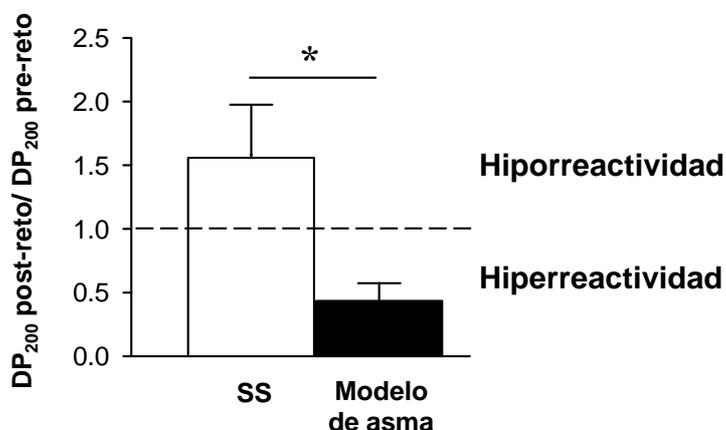
Los valores máximos ( $R_{max}$ ) del índice de bronco-obstrucción ( $iB$ ) observados en el primer reto con OVA (día 15) fueron similares a los observados en el segundo y hasta el doceavo reto (día 25 hasta día 125; Fig. 9). La  $R_{max}$  en cada reto fue significativamente mayor en los cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo sin sensibilizar (SS) ( $p < 0.01$ ; Fig. 9).



**Figura 9. Respuesta bronco-obstrucciona máxima inducida por el reto con OVA en cobayos sensibilizados.** Los valores fueron obtenidos en cada grupo como la media del índice de bronco-obstrucción ( $iB$ ) máximo ( $R_{max}$ ) registrado durante la primera hora después del reto con OVA. Los cuadros negros corresponden a cobayos que tuvieron respuestas  $\geq 200\%$  del  $iB$  basal (modelo de asma). Los cuadros blancos corresponden a cobayos sin sensibilizar (SS) que únicamente recibieron solución salina fisiológica (SSF) durante los retos. Los símbolos representan las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por cada grupo; \* $p < 0.01$ , ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

## 7.2. Reactividad de las vías aéreas.

La reactividad de las vías aéreas fue evaluada comparando curvas dosis-respuesta a histamina antes y después del reto con OVA. Las curvas fueron terminadas una vez que los cobayos alcanzaron la dosis provocativa 200 ( $DP_{200}$ ) es decir, aquella dosis que triplicó el valor basal del íB. El cociente de la  $DP_{200}$  pos-reto/ $DP_{200}$  pre-reto representa el grado de reactividad de las vías aéreas. Valores menores a uno indican que la  $DP_{200}$  post-reto fue menor a la  $DP_{200}$  pre-reto, lo que representa un incremento en la reactividad de las vías aéreas o hiperreactividad. Valores mayores a uno indican que la  $DP_{200}$  post-reto fue mayor a la  $DP_{200}$  pre-reto, lo que representa una disminución en la reactividad de las vías aéreas o hiporreactividad. El cociente de la  $DP_{200}$  pos-reto/ $DP_{200}$  pre-reto fue menor a uno en los cobayos del modelo de asma, mientras que en el grupo SS fue mayor a uno. El incremento en la reactividad de las vías aéreas fue estadísticamente significativo en el grupo del modelo de asma en comparación con el grupo SS ( $p < 0.05$ ; Fig. 10).

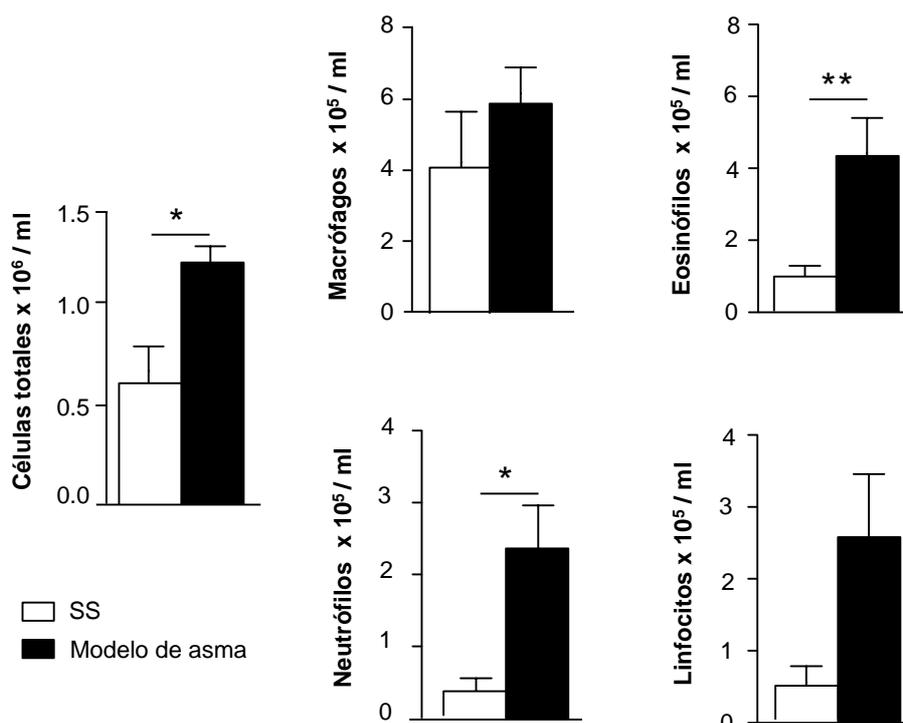


**Figura 10. Reactividad de las vías aéreas a histamina en un modelo de asma alérgica en cobayo.** La gráfica muestra el cociente de la dosis provocativa 200 ( $DP_{200}$ ) de cobayos del modelo de asma y cobayos sin sensibilizar (SS). La línea discontinua en el centro de la gráfica señala el límite entre hiporreactividad (valores mayores a 1) e hiperreactividad (valores menores a 1). Las barras corresponden a las medias,  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos en cada grupo;  $*p < 0.05$ , prueba no pareada de t de Student.

### 7.3 Conteo celular total y diferencial en LBA.

El número de células inflamatorias totales en el LBA fue obtenido por tinción con azul tripán y se expresó en millones de células por mililitro. El número de células inflamatorias totales fue mayor en los cobayos del modelo de asma en comparación con los cobayos del grupo sin sensibilizar ( $p < 0.5$ ; Fig. 11).

El conteo celular diferencial se realizó mediante la tinción Romanowsky y se expresó en miles de células por mililitro. El número de eosinófilos y de neutrófilos en el LBA de los cobayos del modelo de asma fue significativamente mayor en comparación con los cobayos del grupo sin sensibilizar ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente; Fig.11). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de macrófagos y de linfocitos entre los grupos (Fig. 11).

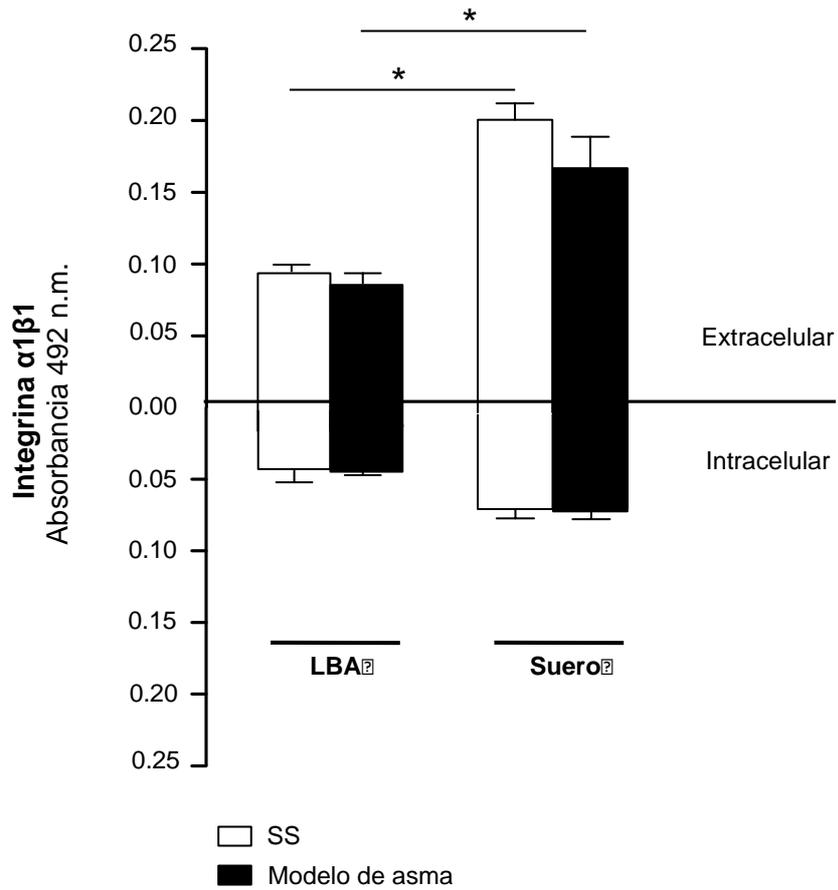


**Figura 11. Conteo celular total y diferencial en el lavado bronquioalveolar de cobayos expuestos a reto con ovoalbúmina.** En cada panel se muestra el número de células inflamatorias totales y diferenciales en cobayos sin sensibilizar (SS) y cobayos del modelo de asma. Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de  $n=6$  cobayos por grupo; \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  prueba no pareada de t de Student.

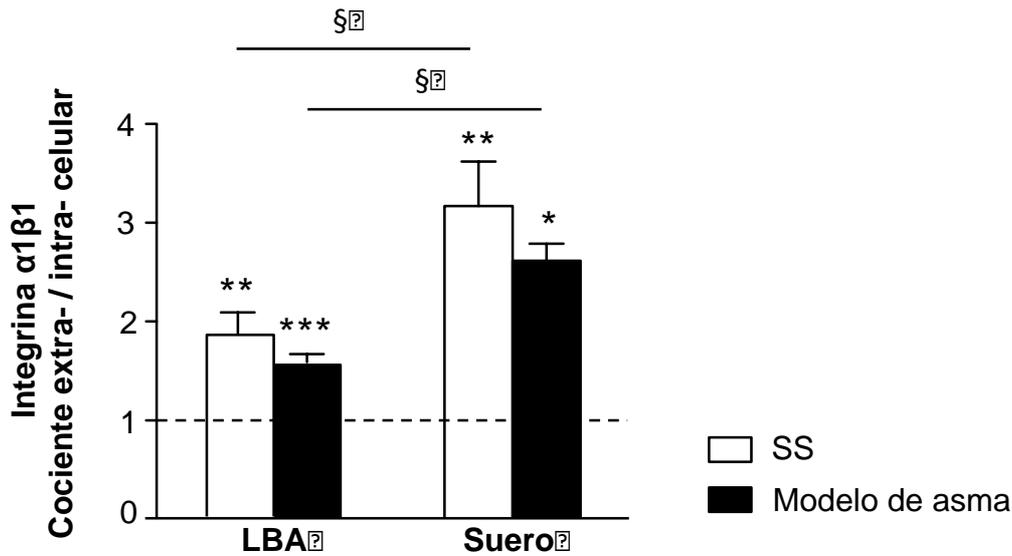
#### **7.4. Cuantificación de la integrina $\alpha 1\beta 1$ en LBA y suero.**

La forma soluble de los dominios intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se cuantificaron mediante ELISA de tipo directo en LBA y suero de los cobayos. Los resultados se expresaron como la absorbancia a una densidad óptica de 492 nm.

Los niveles de los dominios extracelular e intracelular de la integrina en el LBA y en el suero no fueron diferentes entre los cobayos del modelo de asma y los cobayos sin sensibilizar (Fig. 12). Sin embargo, los niveles del dominio extracelular de la integrina fueron significativamente mayores en el suero de los cobayos en comparación con los niveles de la integrina en el LBA ( $p < 0.05$ ; Fig. 12). Adicionalmente, el dominio extracelular se encontraba en mayor proporción con respecto al dominio intracelular en el LBA y en el suero de los cobayos (Fig. 12). Para determinar cuál era la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular realizamos un cociente entre los niveles de ambos dominios. En todos los grupos se observó un incremento significativo en la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular, tanto en el LBA como en el suero de los cobayos ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.01$ ; Fig. 13). Adicionalmente, el cociente de la expresión de los dominios extracelular e intracelular fue significativamente mayor en el suero de los cobayos SS y del modelo de asma en comparación con el LBA ( $p < 0.01$ ; Fig. 13), lo que nos sugiere que la forma soluble de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  puede ser detectada en mayor cantidad en el suero que en el LBA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el cociente de los dominios extracelular e intracelular entre los cobayos del modelo de asma y los cobayos SS (Fig. 13).



**Figura 12. Expresión del dominio intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha1\beta1$  en LBA y suero.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de la concentración de integrina expresada como la absorbancia a 492 nm en cobayos sin sensibilizar (SS) y en cobayos del modelo de asma, n=6; \*p<0.05 y \*\*p<0.01 prueba no pareada de t de Student.

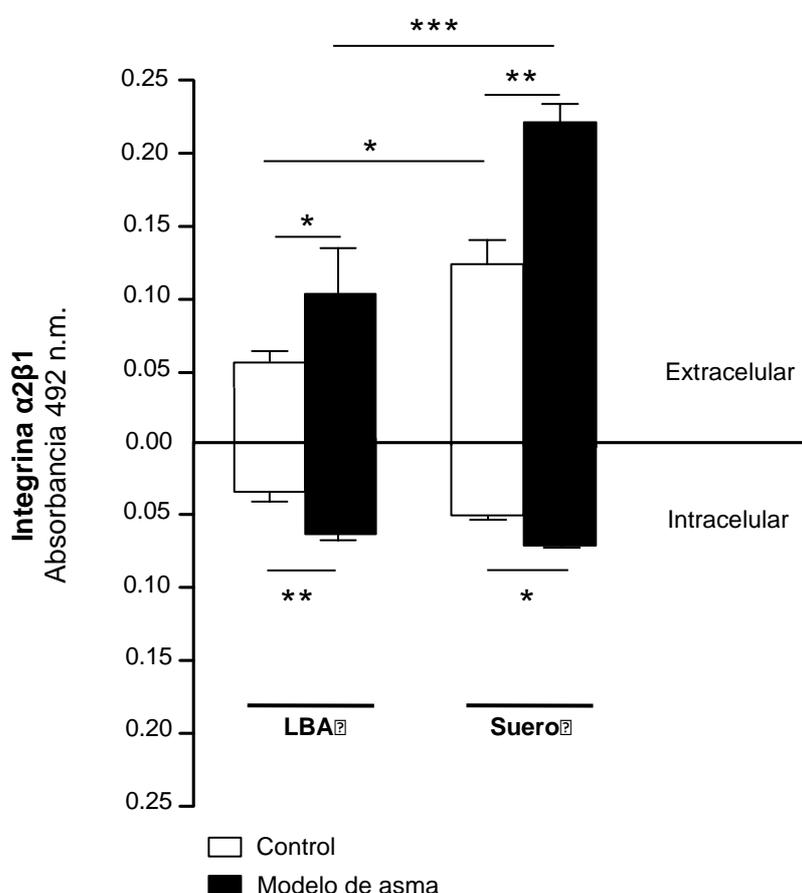


**Figura 13. Cociente de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en LBA y suero de cobayos sin sensibilizar (SS) y cobayos del modelo de asma.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de  $n=6$  cobayos por grupo; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , prueba pareada de t de Student en comparaciones entre la expresión del dominio extracelular y el dominio intracelular; § $p<0.01$ , prueba no pareada de t de Student entre el cociente de las muestras de LBA y suero.

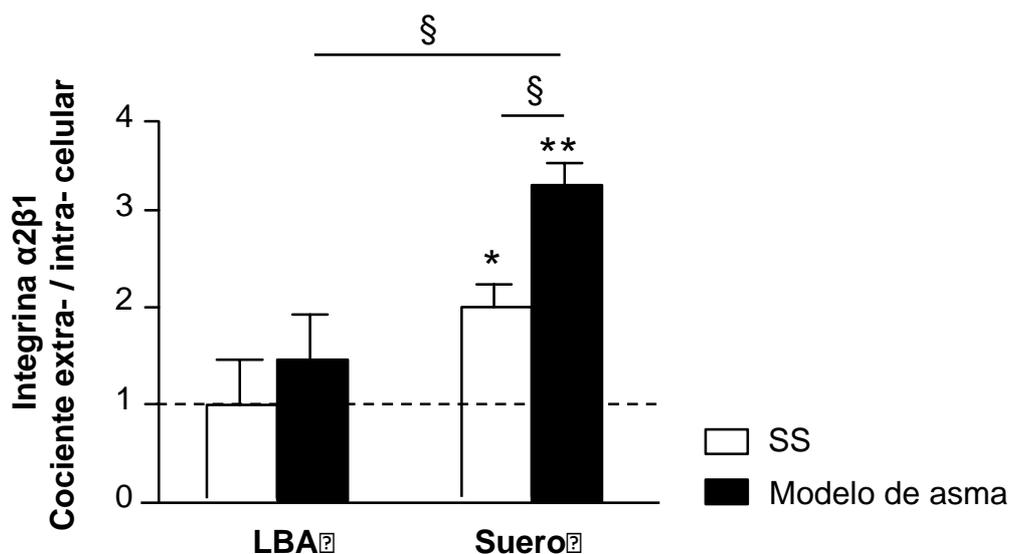
### 7.5 Cuantificación de la integrina $\alpha 2\beta 1$ en LBA y suero.

En los cobayos del modelo de asma se observó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de los dominios extracelular e intracelular de la integrina tanto en el LBA como en el suero en comparación con los cobayos sin sensibilizar ( $p<0.05$  y  $p<0.01$ ; Fig. 14). Los niveles del dominio extracelular de la integrina fueron significativamente mayores en el suero de los cobayos en comparación con los niveles de la integrina en el LBA ( $p<0.05$  y  $p<0.001$ ; Fig. 14). Adicionalmente, el dominio extracelular se encontraba en mayor proporción con respecto al dominio intracelular en el suero de los cobayos (Fig. 14). Para determinar cuál era la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular realizamos un cociente entre los niveles de ambos dominios. En el LBA de los cobayos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la forma soluble del dominio extracelular y la forma soluble del dominio intracelular de la integrina (Fig. 15), mientras que en el suero de los cobayos los niveles del dominio extracelular fueron significativamente mayores a los niveles del dominio intracelular tanto en el

grupo SS como en el grupo del modelo de asma ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente; Fig. 15). Adicionalmente, el cociente de la expresión del dominio extracelular con respecto al dominio intracelular de la integrina en el suero de los cobayos fue significativamente mayor en el grupo del modelo de asma en comparación con el grupo SS ( $p < 0.001$ ; Fig. 15). En los cobayos del modelo de asma el cociente fue significativamente mayor en el suero en comparación con el LBA ( $p < 0.01$ ; Fig. 15). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el cociente obtenido para los grupos SS (Fig. 15).



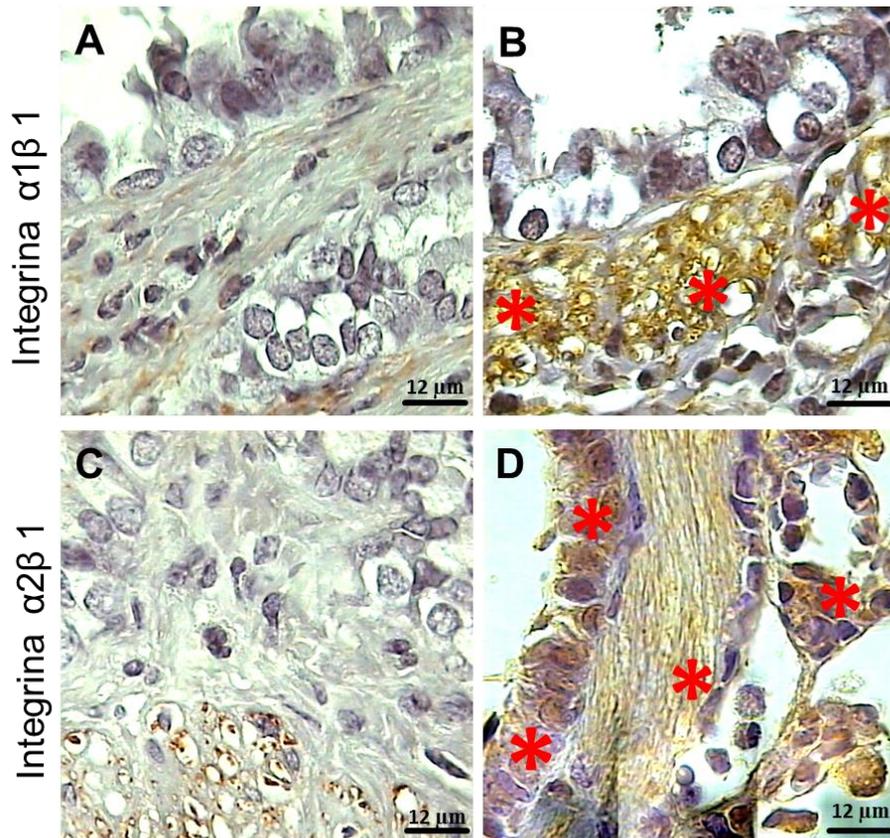
**Figura 14. Expresión del dominio intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en LBA y suero.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de la concentración de integrina expresada como la absorbancia a 492 nm en cobayos sin sensibilizar (SS) y en cobayos del modelo de asma,  $n=6$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  prueba no pareada de t de Student.



**Figura 15. Cociente de la forma soluble del dominio intracelular y extracelular de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en LBA y suero de cobayos sin sensibilizar (SS) y cobayos del modelo de asma.** Las barras corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de  $n=6$  cobayos por grupo; \* $p<0.05$  y \*\* $p<0.001$ , prueba pareada de t de Student en comparaciones entre la expresión del dominio extracelular y el dominio intracelular; § $p<0.001$ , prueba no pareada de t de Student entre el cociente de las muestras de LBA y suero.

### 7.6 Identificación de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en tejido pulmonar.

Las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  se identificaron en secciones de pulmón mediante inmunohistoquímica y se analizaron en un microscopio de campo claro. En los cobayos SS las integrinas se observaron de manera escasa en vasos sanguíneos y en la región adventicia (Fig. 16A y 16C). En los cobayos del modelo de asma se observó una sobreexpresión de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en el mucosa subepitelial y en el músculo liso (Fig. 16B), mientras que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se observó principalmente en el epitelio, el músculo liso, la mucosa subepitelial y en la región adventicia (Fig. 16D).

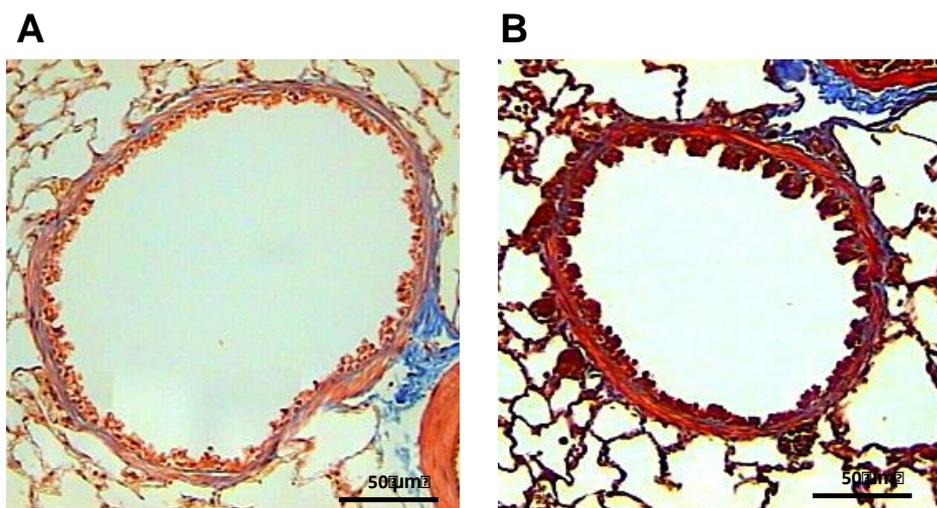


**Figura 16. Fotomicrografías de la expresión de las integrinas  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha2\beta1$  en secciones de pulmón.** La expresión de las integrinas en la mucosa subepitelial se muestra en color café y se realizó mediante análisis de inmunohistoquímica. Expresión de la integrina  $\alpha1\beta1$  en (A) cobayos sin sensibilizar (SS), (B) cobayos del modelo de asma y expresión de la integrina  $\alpha2\beta1$  en (C) cobayos SS y (D) cobayos del modelo de asma. La escala de las barras corresponde a 12  $\mu\text{m}$ .

### **7.7 Tinción de estructuras subepiteliales mediante la técnica tricrómica de Masson.**

Las integrinas se han asociado al desarrollo de la fibrosis subepitelial que se caracteriza por un incremento en los componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena. Para ello, secciones de pulmón fueron teñidas con la tinción tricrómica de Masson para diferenciar las fibras colágena de las fibras del músculo liso. En la figura 17 se muestra la acumulación de colágena como bandas continuas en azul, mientras que las capas de músculo liso se muestran en color rojo.

En los paneles se muestra una vista panorámica de los bronquiolos. En los cobayos del grupo SS (Fig. 17A) se observó una delgada capa de fibras de colágena en la región subepitelial, mientras que en los cobayos del modelo de asma (Fig. 17B) se observó una fuerte coloración azul en estructuras subepiteliales, lo que indica que la mucosa subepitelial estaba compuesta principalmente por tejido fibroso. En el modelo de asma también se distingue un engrosamiento de la capa de músculo liso (Fig. 17B).



**Figura 17. Características histológicas representativas de la mucosa subepitelial.** Las secciones de pulmón fueron teñidas mediante la técnica tricrómica de Masson (A). Sección de pulmón de un cobayo sin sensibilizar (SS) y (B) sección de pulmón que muestra el bronquiolo de un cobayo del modelo de asma. Las áreas con fibrosis se muestran en azul y el músculo liso en rojo. La escala de las barras corresponde a 50 µm.

## 8. DISCUSIÓN

La respuesta obstructiva de las vías aéreas es la alteración funcional característica en el asma y ocurre después de la exposición al alérgeno debido a la liberación de mediadores inflamatorios (Galli et al, 2008; GINA, 2009; Vargas-Becerra, 2009). Estos mediadores son liberados principalmente por las células inflamatorias infiltradas en las vías aéreas, lo que contribuye a la obstrucción (Cockcroft et al, 2006; Galli et al, 2008). En nuestro modelo de asma alérgica en cobayo la exposición a aerosoles de OVA indujo desde el primer reto una bronco-obstrucción inmediata cuya magnitud triplicó el  $\dot{V}_B$ , esta respuesta se observó a lo largo de los doce retos. La respuesta inflamatoria durante la exacerbación asmática se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos seguido por una acumulación de eosinófilos (Bazán-Perkins et al, 2012; Bazán-Socha, 2012). El infiltrado de eosinófilos está relacionado con la persistencia de la inflamación de las vías aéreas (Fougerolles et al, 2000; Bathel et al, 2008). En nuestro estudio observamos que se incrementó significativamente el número de eosinófilos y neutrófilos en los cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo SS. Algunos estudios han descrito que la inhibición de moléculas de adhesión, que contribuyen a la extravasación de eosinófilos hacia las vías aéreas, induce la disminución de la inflamación (Bathel et al, 2008; Bara et al, 2010). Probablemente en nuestro modelo el infiltrado de células inflamatorias hacia las vías aéreas, particularmente eosinófilos, contribuya de manera importante a la respuesta obstructiva y a la persistencia de la inflamación.

En el asma la hiperreactividad de las vías aéreas se manifiesta mediante crisis recurrentes de síntomas respiratorios que están asociados con la obstrucción del flujo de aire (Ying et al, 2006; GINA, 2012). Aún se desconoce el mecanismo preciso que induce la hiperreactividad, pero se considera que la inflamación y los cambios en la estructura de las vías aéreas inducidas por la inflamación crónica desempeñan un papel importante. En nuestros resultados el incremento en la reactividad de las vías aéreas fue estadísticamente significativo en el grupo del modelo de asma en comparación con el grupo SS. La reactividad de las vías aéreas se midió en el doceavo reto antigénico, posiblemente los cambios en la estructura de las vías aéreas inducidos por la inflamación crónica ya se habían presentado. Dos de las consecuencias de la inflamación crónica durante el desarrollo de asma que incrementan la hiperreactividad son el engrosamiento de la capa de músculo liso y la

acumulación de colágena, en ambas, se ha descrito que las integrinas tienen un papel importante (Nguyen et al 2005). La acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular, proceso denominado fibrosis subepitelial resulta del engrosamiento y la rigidez de la pared de las vías aéreas reduciendo su calibre y distensibilidad (Herrero, 2001; Bonacci et al 2006; Huerta, 2009). En este estudio utilizamos la técnica tricrómica de Masson para diferenciar las fibras colágena del tejido muscular. Nuestros datos mostraron la acumulación excesiva de tejido fibroso en estructuras subepiteliales y el incremento en la masa del músculo liso. En otros estudios en cobayo se ha descrito la acumulación de colágena desde el sexto reto antigénico (Moreno-Álvarez et al, 2010). En pacientes con asma se han cuantificado algunos componentes de la matriz extracelular, la colágena I y III fueron las más abundantes (Araujo et al 2008). Adicionalmente se ha descrito que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  estimula la síntesis de colágena I y fibronectina en las vías aéreas (Bazan-Soucha et al., 2012b; Peng et al, 2005). En nuestro estudio la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se encontró en la mucosa subepitelial y en el músculo liso mientras que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se observó principalmente en el epitelio, el músculo liso, la mucosa subepitelial y en la región adventicia. Probablemente la sobre-expresión de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  podrían contribuir a la regulación de la síntesis y degradación de colágena y ocasionar un exceso y posterior depósito en las vías aéreas.

Los receptores de colágena tienen un papel importante durante la síntesis y degradación de colágena siendo las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  los principales receptores para colágena (Gardner et al 1999; Fougerolles et al 2000). Se ha descrito que la integrina  $\alpha 1\beta 1$  reconoce principalmente colágena tipo IV mientras que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  reconoce colágena tipo I (Jokinen et al, 2004). En nuestros resultados los niveles de los dominios extracelular e intracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  en el LBA y en el suero no fueron diferentes entre los cobayos del modelo de asma y los cobayos SS. En otros estudios se han realizado ensayos de unión con estos receptores y se ha descrito que la integrina  $\alpha 1\beta 1$  se une a los monómeros de colágena I mientras que  $\alpha 2\beta 1$  se une a la colágena fibrilar y a los monómeros de colágena I (Jokinen et al, 2004). Adicionalmente, también se ha descrito que las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  son los principales receptores para colágena pero la transducción de la señal es distinta. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  involucra la activación de la cascada de MAP cinasas. Las MAP cinasas y el factor de transcripción P1 están implicados en la regulación de los genes que codifican para colágena (Gardner et al, 1999). En los cobayos del modelo de asma se observó un incremento

estadísticamente significativo en los niveles de los dominios extracelular e intracelular de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  tanto en el LBA como en el suero en comparación con los cobayos SS. En otros estudios se ha descrito a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  incrementada en linfocitos T activados en sangre periférica en pacientes con asma severa y se ha asociado con el incremento de la hiperreactividad (Araujo, 2008; Murdoch et al, 2010; Bazan-Socha et al., 2012). Posiblemente la integrina  $\alpha 2\beta 1$  tiene mayor afinidad por las colágenas encontradas en suero y LBA.

En nuestros experimentos encontramos que existe un incremento del dominio extracelular no asociado a células de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  lo que nos sugiere que hubo una fragmentación del receptor. La escisión proteolítica es el clivaje de un receptor de membrana por una colagenasa o metaloproteinasa y como resultado se libera el dominio extracelular y el dominio intracelular (Gullberg et al, 2002; Hayashida et al, 2010). Otro mecanismo de escisión proteolítica es el splicing alternativo de transcritos de ARNm. En otros estudios, se ha sugerido que la escisión proteolítica o 'shedding' de receptores de membrana ocurre durante el desarrollo embrionario, la homeostasis y en diferentes condiciones patológicas. El cociente de la expresión de los dominios extracelular e intracelular de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  fue significativamente mayor en el suero de los cobayos SS y del modelo de asma en comparación con el LBA, esto nos sugiere que en nuestro modelo de asma ocurre la escisión proteolítica del dominio extracelular y la liberación del dominio intracelular además nos sugiere que la forma soluble de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  puede ser detectada en mayor cantidad en el suero que en el LBA. El cociente extracelular / intracelular de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en suero fue mayor que el LBA. Este comportamiento se presentó en el grupo SS y en el modelo de asma; sin embargo fue mayor en este último. Se ha descrito que el fragmento de la subunidad  $\beta 1$ , resultado del shedding, estimula la fijación de las células del músculo liso a colágena y el fragmento se une a componentes de matriz que puede ser la misma colágena (Goldsmith et al 2003). Probablemente la escisión del dominio extracelular y la liberación del dominio intracelular principalmente de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  juega un papel importante al estimular la proliferación de las células de músculo liso y la unión con colágena y en conjunto alteran la composición de las vías aéreas. Dos familias de proteínas se cree que están involucradas en la escisión de las integrinas, las metaloproteinasas y ADAMs (Hartmann et al, 2013; Hayashida et al, 2010). Un factor hereditario interviene en la regulación de los genes ADAM (por sus siglas en inglés, *A disintegrin and a metalloproteinase*) que codifican para que las integrinas y

metaloproteinasas encargadas de la proteólisis de constituyentes de la matriz extracelular (Huerta et al, 2009; Larocca et al, 2010). Adicionalmente se ha descrito que la colágena y el TGF- $\beta$  inducen la expresión de ADAMs (Manso et al 2006).

Las integrinas están involucradas en múltiples procesos implicados en la remodelación de las vías aéreas, por ejemplo, el reclutamiento de células inflamatorias durante la inflamación alérgica (White et al, 2004). Particularmente, se ha descrito que existe una relación entre la sobre-expresión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y el incremento en el reclutamiento y migración de eosinófilos. El infiltrado de eosinófilos está relacionado con la persistencia de la inflamación de las vías aéreas (Fougerolles et al, 2000; Bathel et al, 2008). Adicionalmente, se ha sugerido que las integrinas pueden ser un blanco terapéutico en el asma (Abraham et al, 2004; Bazán-Socha et al, 2012). En otros estudios se ha referido que antagonistas de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  reducen la respuesta inflamatoria inducida por el alérgeno (Selistre de Araujo, 2005; Bazan-Socha et al 2012c). Adicionalmente se ha descrito que existe una asociación entre el depósito excesivo de colágena en el músculo liso de las vías aéreas y la proliferación de este. Al bloquear la interacción mediada por la integrina  $\alpha 2\beta 1$  entre el músculo liso de las vías aéreas y la colágena se reduce la hiperplasia del músculo liso (Bonacci et al, 2006). En conjunto, la fibrosis subepitelial y la hiperplasia del músculo liso ocasionan la reducción residual del calibre de las vías aéreas y provocan repercusiones negativas sobre la función pulmonar (Davies et al, 2003). Lo que nos sugiere que la sobre-expresión de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  inducen cambios en el reclutamiento y la migración de células inflamatorias, además de la proliferación del músculo liso y en la síntesis y degradación de colágena, por lo que el estudio de las integrinas podría ayudar a entender parte de las alteraciones que ocurren durante la remodelación de las vías aéreas.

## 9. CONCLUSIONES

- El incremento de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  en nuestro modelo de asma alérgica en cobayo, principales receptoras de colágena, se encuentra relacionado con el incremento del tejido fibroso en la capa subepitelial de las vías aéreas, posiblemente porque ambas proteínas estimulan la síntesis de colágena.
- El incremento de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  en suero y LBA puede estar asociada al incremento de eosinófilos en el LBA y, por lo tanto, a la persistencia de la inflamación en las vías aéreas.
- La sobre-expresión de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  en el músculo liso podría estar relacionada con la proliferación este tipo de células y en conjunto, con la obstrucción residual de las vías aéreas.
- La escisión proteolítica y liberación de los dominios extracelular e intracelular de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  detectadas en el suero y en el LBA posiblemente esté relacionada con el incremento de la hiperreactividad. Probablemente, la expresión de estas integrinas esté asociada a la excesiva síntesis y a la acumulación de colágena incrementando la hiperreactividad de las vías aéreas.
- La expresión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en el suero podría ser una herramienta para el diagnóstico de la fibrosis subepitelial.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham WM, Ahmed A, Serebriakov I, Carmillo A, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber AE, GotwalsPJ, Koteliansky, Taylor F, Lobb RR. 2004. A Monoclonal Antibody to  $\alpha 1\beta 1$  Blocks Antigen-induced Airway Responses in Sheep. *Am J Respir Care Med* Vol 169: 97-104.
2. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. 2008. Extracellular matrix components and regulator in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir*. 32:61-69.
3. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. 2010. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Eur Rep J*. 36: 1174-1184.
4. Bathel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. 2008. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 83: 1-12.
5. Bazán-Perkins BM, Campos M, Sánchez-Guerrero E. 2012. Polimerized Type I Collagen reverts airway hyperresponsiveness and fibrosis in a guinea pig asthma model. *Inflammatory Diseases. Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. Ed. Dr. Mahin Khatami. 319-332.
6. Bazán-Perkins BM, Sánchez-Guerrero E, Vargas MH, Martínez E, Ramos P, Álvarez M, Hiriart G, Gaxiola M, Hernández R. 2009.  $\beta 1$ -Integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clinical et Experimental allergy*. (39): 740-751.
7. Bazán-Perkins BM, Vargas MH, Sánchez-Guerrero E, Chávez J, Montañó LM. 2004. Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental Physiology*. 89 (5): 623-628.
8. Bazan-Socha S, Żuk J, Jakiela G, Pelka K, Musial J. 2012. Increased expression of  $\alpha 2$  (CD49b),  $\alpha 4$ (CD49d) and  $\beta 1$  (CD49) integrin subunits on peripheral blood T lymphocytes in clinically stable mild-to-moderate persistent asthma. *Pol Arch Med Wewn*. 122 (12): 585-895.
9. Bazan-Socha S, Żuk J, Musial J. 2012. Increased expression of selected very late antigen integrin subunits on CD4 and CD8 lymphocytes in patients with clinically stable asymptomatic atopic asthma. *Postepy Dermatologii Alergologii XXIX*. 337-342.

10. Bazán-Socha S, Žuk J, Plutecka H, Marcinkiewicz C, Zareba L, Musial J. 2012. Collagen Receptors  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins are involved in transmigration of peripheral blood eosinophils, but not mononuclear cells through human microvascular endothelial cells monolayer. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 63 (4): 373-379.
11. Bengtsson T, Camper L, Schneller M, Lundgren-Akerlund. 2001. Characterization of the mouse integrin subunit  $\alpha 10$  gene and comparison with its human homologue genomic structure, chromosomal localization and identification of splice variants. *Matrix Biology* (20) 565 - 576.
12. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. 2010. Airway remodeling in asthma: From benchside to clinical practice. *Can Resp J* 17(4): E85-E94.
13. Bousquet J, Jeffery PK, Busse W, Johns, n M, Vignolia A. 2000. From Bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-1745.
14. Blumbach K, Niehoff A, Belgardt B, EhlenHW, Hallinger R, Schulz JN, Brüning, Krieg T, Schubert M, Gullberg D, Eckes B. 2012. Dwarfism in Mice Lacking Collagen-binding Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 11\beta 1$  is Caused by severity Diminished IGF-1 Levels. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 287 No.9 6431-6440.
15. Buehler KM, Wilson EL. 2008. Performance Assessment of Bronchospasm Management Among Second Year Nurse Anesthesia Residents Using the Human Patient Simulator. *ProQuest*. 47 p.
16. Campos MG, Toxqui E, Tortoriello J, Oropeza MV, Ponce H, Vargas MH, Montaña LM. 2001. Galphimiaglauca organic fraction antagonizes LTD-4 induced contraction in guinea pig airways. *Ethnopharmacol*. 74:7-15.
17. Carrillo T, Martínez JA, Cumplido JA. 2006. Diferentes tipos de respuesta inflamatoria en el asma. *ArchBronconeumol*. 42 Supl.1:13-9.
18. Cockcroft D, Davis E. 2006. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 118(3): 551-559.
19. De Zubiría E, De Zubiría-Salgado E, De Zubiría A. 2003. Asma bronquial. 2ª edición. Editorial Panamericana. 684p.
20. Des JT, Balderrama EF. 1993. Enfermedades respiratorias, manifestaciones clínicas, ed. El manual moderno, 453 pág.
21. Dekkers BG, Bos ST, Gosens R, HalaykoAJ, ZaagsmaJ, Meuers H. 2010. The integrin-blocking peptide RGDS inhibits airway smooth muscle remodeling in

- a guinea pig model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. Vol 181: 556-565.
22. Emsley J, Graham-Knight C, Farnadale R, Barnes J. 2012. Structure of the integrin  $\alpha 2\beta 1$ -binding collagen peptide. *J. Mol. Biol.* 335: 1019-1028.
  23. Fougerolles AR, Sprague AG, Ickerson-Nutter CL, Chi-Rosso G, Rennert PD, Gardner H, Gotwals PJ, Lobb RR, Kotliansky VE. 2000. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  in models of hypersensitivity and arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 105:721-729.
  24. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky A. 2008. A development of allergic inflammation. *Nature*. 454: 445-455.
  25. García-Marcos, L. 2004. Genes, medio ambiente y asma. *AnPediatric, Monogr* 2(1): 9-29.
  26. Gardner H, Broberg A, Pozzi A, Laato M, Heino J. 1999. Absence of integrin  $\alpha 1\beta 1$  in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *Journal of Cell Science*. 112: 263-272.
  27. Global Initiative for Asthma. (GINA) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2012. [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
  28. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2006. *Immunology*. 5a ed. W.H. Freeman. Nueva York. 603 p.
  29. Goldsmith E, Carver W, McFadden A, Goldsmith J, Price R, Sussman M, Lorell BH, Cooper G, Borg TK. 2003. Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284: H2227-H2234.
  30. Graham LM. 2006. *Classifying Asthma* *Chest*. 130:13S–20S.
  31. Gullberg D, Lundgren-Akerlund E. 2002. Collagen-Binding I Domain Integrins- What do they do? *Progr Histochem Cytochem*. Vol 37. No.1:3-54.
  32. Harris ES, McIntire TM, Prescottt SM, Zimmerman GA. 2000. The Leucocyte Integrins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275 No. 31. 23409-23412.
  33. Hartmann M, Herrlich A, Herrlich P. 2013. Who decides when to cleave an ectodomain? *Trends in a biochemical sciences*. Vol. 38 No. 3: 112-120.
  34. Harver A, Kotses H. 2010. *Asthma, Health and Society: A Public health Perspective*. 1st Edition. Springer. 360p.
  35. Hayashida K, Bartlett A, Chen Y, Woo P. 2010. Molecular and Cellular mechanisms of Ectodomain Shedding. *The anatomical record*. 293: 925-937.

36. Heino J. 2000. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biology* 19: 319-323
37. Herrero TV. 2001. Remodelación de las vías aéreas en el asma; fisiología de la matriz extracelular y función de los glicosaminoglicanos. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*. Vol. 32 No. 2.
38. Huttenlocher A, Horwitz AR. 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3: 1-16.
39. Huerta J, Jiménez C, del Olmo H, Maza M. 2009. Remodelación de la vía aérea en asma. *Alergia, asma e inmunología Pediátricas*. 2 (18): 60-78.
40. Informe anual de labores INER, 2011. Página electrónica: [http://www.iner.gob.mx/archivos/informe\\_labores/2011.pdf](http://www.iner.gob.mx/archivos/informe_labores/2011.pdf)
41. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P. 2004. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *J. Biol. Chem.* 279: 31956-31963.
42. Jung SM, Moroi M. 2000. Activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *Trend cardiovasc Med*. 10: 285-292.
43. Kierszenbaum, L. 2008. *Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica*. 2ª ed. Ed. Elsevier. New York. USA. 671 p.
44. Kim HY, Rosemari H, Dekruyff, Umetsu DT. 2010. The many Paths to asthma: phenotype shape by innate and adaptative immunity. *Nature immunology*. 11:557-583.
45. Larocca NE, Moreno D, Garmendia L, De-Sanctis JB. Niveles séricos de MMP-9 y del inhibidor tisular de MMP tipo1 en pacientes venezolanos con asma o con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). *Revista de la Facultad de Medicina*, Vol. 33 Núm. 1: 6-10.
46. Lukacs N. 2001. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol*. 1(2):108-116.
47. Macías-Abraham, C. 2006. Moléculas de adhesión, importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 2006; 22 (2).
48. Mader S, Pendarvis M. 2007. *Biology*. 9th edition. USA. McGraw-Hill. 950 p.
49. Manso AM, Elsherif L, Kang S, Ross RS. 2006. Integrins, membrane-type matriz metalloproteinases and ADAMs: Potential implications for cardiac remodeling. *Cardiovascular Reseach* 69: 574-584.
50. Moore WC, Evans MD, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Erzurum SC, Carrant Everett D, Dweik Ra, Gaston B, Hew G, Israel E, Mayse ML, Pascual RM, Peters SP, Silveira L, Wenzel SE, Jarjour

- NN. 20122. Safety investigative bronchoscopy in the severe asthma research program. *J Allergy Clin Immunol.*128 (2): 328-336.
51. Moreno-Álvarez P, Sánchez-Guerrero E, Martínez-Cordero E, Hernández-Pando R, Campos MG, Cetina L, Bazán-Perkins B. 2010. Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung.* Vol. 188. No. 2: 97-105.
52. Moreno-Bolton. 1995. Hiperreactividad bronquial. *Boletín Esc. de Medicina P. Universidad Católica de Chile.* 24:59-63.
53. Muller, W. 2002. Leukocyte-Endothelial Cells Interactions in the Inflammatory Responses. Lippincott Williams. Volume 82 (5); 521-533.
54. Nguyen PT, Ward JP, Hirst ST. 2005.  $\beta$ 1- Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectina. *Am J Respir Crit Care Med.* Vol. 171: 217-223.
55. Olaguíbel JM, Álvarez MJ, Uribe P, García BE, Tabar AI. 2003. Nuevas técnicas en el estudio del asma. Sección de Alergología. Hospital Virgen del Camino. Pamplona. *Anales.* Vol. 26, Supl. 2: 57-63.
56. Pease J. 2011. Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochem J.* 434: 11-24.
57. Pello OM, Rodríguez-Frade JM, Martínez-Muñoz M, Mellado M. 2006. Modulación del Tráfico Leucocitario: Papel de las Quimiocinas y Opioides. *Inmunología.* Vol. 25 No. 1:39-49.
58. Picó-BergantiñosVM, Ruíz-González M, Picó-Bergantiños T, García-Pérez M. 1999. Marcadores Biológicos para el diagnóstico y tratamiento del asma bronquial. *Rev Cubana Med* 38(1):24-34.
59. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. 2000. Ligand binding to integrins. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 275. No. 29. 21785-21788.
60. Peng Q, Lai D, Nguyen N, Chan V, Matsuda T, Hirst S. 2005. Multiple  $\beta$ 1Integrins mediate enhancement of human airway muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen. *The Journal of Immunology.* 174:2258-2264.
61. Ramos-Ramírez P. 2007. Expresión de las integrinas beta-1 solubles durante la remodelación subepitelial de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. México, D.F. Facultad de Ciencias, UNAM.
62. Riikonen T, Westernmarck J, Koivisto L, Broberg A, KähäriVM. 1995. Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1Is a Positive Regulator of Collagenase (MMP-1) and Collagen  $\alpha$ 1 (I) Gen

- Expression. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 270. Núm. 22. 13548-13552.
63. Ross M, Ross, Wojciech P. 2007. Histología; texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª ed. Ed. Panamericana. 992p.
64. Salas H, Fernández V, Almeida AV. 2009 Clasificación del asma. Neumología y cirugía de tórax. Vol. 68 (S2): S143-148
65. Selistre-de Araujo HS, CominettiMR, TerruggiCHB, Mariano-Oliveira, De Freitas MS, Crepin M, Figueiredo CC, Morandi V. 2005. Alternagin-C, a disintegrin like protein from de venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 38:1505-1511.
66. Silverthorn DU, Johnson BR. 2008. Fisiología humana: Un enfoque integrado. 4a edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 860 p.
67. Soomer B, Vargas MH, Chávez J, Carvajal V, Segura P, Montaña L. 2001. Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O<sub>3</sub>- induced hyperresponsiveness. J Appl. Physiol. 91: 2595-2601.
68. Srichai MB, Zent R. 2010. Cell-extracellular matrix interactions in cancer. Springer science.
69. Schuliga M, Ong SC, Soon L, Zal F, Harris T, Stewart AG. 2010. Airway smooth muscle remodels pericellular collagen fibrils: implications for proliferation. Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol 298: L584-L592.
70. Takada Y, Ye X, Simon S. 2007. The integrins. Genome Biol. 8 (5): 215.
71. Tinoco-Cuellar M. 2012. Relación entre la expresión de integrinas solubles con la hiperreactividad y la inflamación de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. México, D.F. Facultad de Ciencias, UNAM.
72. Vargas-Becerra MH. 2009. Fisiopatología del asma. Neumología y Cirugía de Tórax. Vol 68 (S2): S111-S115.
73. Vargas-Becerra MH. 2005. Patogenia del asma. En: Asma. Enfoque integral para Latinoamérica. México. McGraw-Hill. Médica Panamericana.
74. Welsch U, Sobotta J. 2009. Histología. 2a edición. Ed. Médica Panamericana. 688 p.
75. White DJ, Puranen S, Johnson M, Heino J. 2004. The collagen receptor subfamily of the integrins. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 36: 1405-1410.

76. Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. 2006. How much do we know about atopic asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol.* 3(5):321-32.
77. Zent R, Pozzi A. 2010. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer.* Springer in New York.