



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Alta expresión de laminina en el músculo liso bronquial y
vascular pulmonar de cobayos no respondedores al reto
antigénico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

IVONNE PACHECO ALBA



**DIRECTOR DE TESIS:
BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Alta expresión de laminina en el músculo liso bronquial y vascular pulmonar de cobayos no respondedores al reto antigénico

realizado por **Ivonne Pacheco Alba** con número de cuenta **307224534** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietaria Dra. Patricia Rivas Manzano

Propietaria Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins
Tutora

Suplente Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Suplente M. en F. Angélica Flores Flores

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F., A 30 DE NOVIEMBRE DE 2015

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre María de Jesús Alba Gutiérrez quien me ha brindado su amor y me ha apoyado a lo largo de la carrera y de la vida, alentándome a seguir adelante y superarme a mí misma aun en momentos difíciles. A mi padre Rosendo Pacheco Ortiz por su apoyo y amor. A mis hermanos Geovanni Pacheco Alba y Víctor Pacheco Alba por estar conmigo en cualquier circunstancia y brindarme su consejo. Mi familia es la mayor fuente de inspiración a ellos dedico esta tesis.

A la Doctora Blanca Margarita Bazán Perkins quien me apoyó a la realización de este trabajo. Agradezco por el tiempo que invirtió y por el conocimiento que me ha transmitido, además de los consejos que me ha dado y por permitirme obtener mis logros.

Agradezco a Alejandra Ortega por su amistad, apoyo y confianza a lo largo de los años, a Nuria, Monserrat y Mariel por su amistad a lo largo de la carrera. También agradezco a Jesús Canales por su amor y compañía.

A Erika Liliana Monterubio Flores y Guadalupe Hiriart Valencia quienes me brindaron su amistad, consejo y ayuda durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Vías aéreas.....	3
1.2 Asma.....	4
1.2.1 Definición.....	4
1.2.2 Etiología.....	4
1.2.3 Epidemiología.....	5
1.3 Bronco-obstrucción.....	5
1.4 Hiperreactividad.....	6
1.5 Músculo liso.....	8
1.5.1 Músculo liso de las vías aéreas.....	9
1.5.2 Músculo liso vascular.....	9
1.6 Cambios estructurales en el asma.....	10
1.6.1 Remodelación en el músculo liso de las vías aéreas.....	11
1.6.2 Remodelación en el músculo liso vascular.....	12
1.7 Laminina e integrina.....	13
1.7.1 El papel de la laminina y las integrinas en el músculo liso en el asma.....	15
1.7.2 Laminina-integrina $\alpha 6$	16
1.8 Modelo de asma en el cobayo.....	16
2. Justificación	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
5. Material y método	21
Animales.....	21
Modelo experimental.....	21

Pletismografía barométrica.....	23
Reactividad de las vías aéreas.....	25
Obtención de muestras de pulmón.....	26
Inmunohistoquímica.....	26
Observación al microscopio.....	27
Análisis semicuantitativo.....	27
Análisis estadístico.....	28
6. Resultados.....	30
Obstrucción inducida por OVA.....	30
Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso bronquial.....	31
Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar.....	33
Intensidad de la marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en músculo liso bronquial.....	36
Intensidad de la marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en músculo liso arterial intrapulmonar.....	39
Correlación de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial.....	41
Correlación de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar.....	42
7. Discusión.....	44
8. Conclusión.....	46
9. Referencias.....	47

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Divisiones de la vía aérea.....	3
Figura 2. Bronquios con y sin bronco-obstrucción.....	6
Figura 3. Curva de histamina o metacolina	7
Figura 4. Células de músculo liso.....	8
Figura 5. Remodelación de un vaso sanguíneo.....	13
Figura 6. Laminina y su unión a integrina.....	15
Figura 7. Modelo experimental.....	22
Figura 8. Equipo de pletismografía.....	23
Figura 9. Cambios de presión en un ciclo respiratorio.....	24
Figura 10. Curvas de histamina.....	25
Figura 11. Resumen de la metodología.....	28
Figura 12. Comparación de los grupos establecidos.....	29
Figura 13. Obstrucción inducida por OVA.....	30
Figura 14. Detalle del músculo liso bronquial.....	31
Figura 15. Marca de laminina en músculo liso bronquial.....	32
Figura 16. Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso bronquial.....	33
Figura 17. Detalle del músculo liso arterial intrapulmonar.....	34
Figura 18. Marca de laminina en el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar.....	35
Figura 19. Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar.....	36
Figura 20. Marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial...37	
Figura 21. Intensidad de la marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial.....	38
Figura 22. Marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso vascular pulmonar.....	40

Figura 23. Intensidad de marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar.....	41
Figura 24. Correlación de la expresión de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial.....	42
Figura 25. Correlación de la expresión de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar	43
Cuadro 1. Principales diferencias entre cobayos modelo de asma y cobayos no respondedores al reto antigénico.....	17

RESUMEN

Introducción: El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar obstrucción reversible del flujo de aire, hiperreactividad e inflamación. La inflamación persistente provoca cambios patológicos en la vía aérea mejor conocidos como remodelación, que incluye: hiperplasia e hipertrofia de células musculares y acumulación de componentes de matriz extracelular, como fibronectina, elastina, laminina y colágenas I, III, IV y V. Los vasos sanguíneos pulmonares también presentan remodelación, generalmente hiperplasia. En el asma atópica el músculo liso presenta hiperreactividad que podría relacionarse con las alteraciones de la matriz extracelular ya que la acumulación alterada de matriz extracelular puede alterar el calibre de la vía aérea y la función del músculo liso. Para la investigación del asma se emplean modelos animales experimentales como el del cobayo, donde es posible desarrollar modelos de asma mediante sensibilización a antígenos y observar la bronco-obstrucción inducida por el reto antigénico. Durante la sensibilización algunos cobayos del modelo del asma no presentan bronco-obstrucción después de un reto (cobayos no respondedores). Los cobayos no respondedores (NR) no sólo tienen una respuesta fisiológica diferente a los cobayos modelo de asma, sino que también presentan diferencias en el perfil de células inmunológicas presentes en el pulmón. Mientras que los cobayos modelo de asma presentan siempre células Th2 y eosinófilos, los cobayos NR presentan linfocitos Treg, Th1 y neutrófilos. Otra característica de los cobayos NR crónicos, esto es con mayor número de retos antigénicos, es que pierden la hiperreactividad de la vía aérea. La laminina es un componente de la matriz extracelular que ha demostrado regular la supervivencia de las células del músculo liso en el bronquio, así como en mantener un fenotipo hipercontráctil. Este trabajo se enfocó a observar la presencia de laminina y su receptor, específicamente la subunidad de integrina $\alpha 6$, en el músculo liso bronquial y vascular pulmonar de cobayos modelo de asma y NR, ya que como la laminina está relacionada con mantener el fenotipo contráctil hipotetizamos encontrarla en mayor cantidad en el modelo de asma y NR agudos.

Método: Los cobayos fueron sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y cada 10 días fueron retados con el antígeno (OVA), formando 2 grupos, un grupo agudo de 3 retos (35 días) y un grupo crónico de 12 retos (125 días). Cada grupo se subdividió en controles, modelo de asma y NR con 4 cobayos cada uno. Mediante inmunohistoquímica se observó la presencia de laminina y de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial y vascular pulmonar de cada cobayo. Utilizando el programa Image J se determinó la intensidad de marca inmunohistoquímica tanto de laminina como de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en los músculos.

Resultados: Los cobayos NR crónicos presentaron un aumento en la expresión de laminina, mientras que se mantuvo similar en los demás grupos, éste incremento se presentó tanto en músculo liso bronquial como vascular pulmonar.

La subunidad de integrina $\alpha 6$ en comparación de la laminina, se incrementó de forma significativa en cobayos crónicos, en modelos de asma y en NR. *Conclusión:* Se esperaba que la laminina se incrementara en aquellos cobayos que presentan hiperreactividad del músculo liso, sin embargo, se expresa en cobayos NR donde no hay hiperreactividad. Esto sugiere que la laminina no tiene un efecto en el mantenimiento de la contracción del músculo liso bronquial. Tampoco tiene un efecto en la proliferación de los vasos sanguíneos pulmonares. Es probable que la laminina participe en la contención crónica de la respuesta obstructiva alérgica ya que se ha visto en otros estudios que el perfil de linfocitos Th1 se asocia con la alta expresión de laminina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías aéreas

El tracto respiratorio está funcionalmente dividido en la parte conductora (también conocida como vía aérea) y en la parte de intercambio de gases. Las vías aéreas están anatómicamente divididas en la parte superior y en la parte inferior: las vías aéreas superiores se extienden desde las fosas nasales y la boca hasta la laringe y las vías aéreas inferiores de la laringe al bronquiolo¹ (Fig. 1).

Cada parte de las vías aéreas tiene funciones especializadas: humidificación, filtración del aire y el sentido del olfato en la nariz, así como fonación en la laringe.

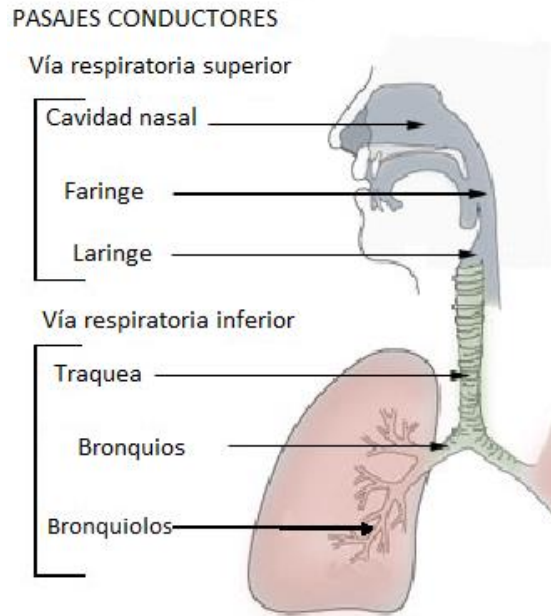


Figura 1. Divisiones de la vía aérea. Modificado de US National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) 2015. <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/respiratory/passages/>.

En general las vías aéreas tienen como principal función la conducción de aire hasta los alveolos y tienen características histológicas compartidas, como la presencia de la capa mucosa que se extiende desde las fosas nasales hasta los bronquiolos, la submucosa que se encuentra justo debajo de la mucosa a lo largo de toda la vía aérea, la capa muscular que se compone de músculo liso y se encuentra en

bronquios y bronquiolos, finalmente se encuentra la capa adventicia que contiene cartílago y tejido conjuntivo que se extiende de la laringe hasta los bronquios. Particularmente los bronquios se componen por la mucosa formada de epitelio pseudoestratificado con células caliciformes y una lámina propia de tejido conjuntivo (humidifica el aire y protege a la vía aérea de partículas y patógenos), una capa muscular, que se compone de una capa continua de músculo liso alrededor del bronquio, una capa submucosa, formada de tejido conjuntivo con glándulas, una capa cartilaginosa, compuesta por placas de cartílago que da forma a la estructura y finalmente, la capa adventicia, compuesta por tejido conjuntivo que se encuentra adyacente a otras estructuras del pulmón^{2,3}. El músculo liso de las vías aéreas presenta un alto contenido de matriz extracelular⁴. Las propiedades mecánicas del músculo liso se ven alteradas en enfermedades como el asma^{5,6}.

1.2 ASMA

1.2.1 Definición

El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar obstrucción reversible del flujo del aire, hiperreactividad e inflamación⁷. También se caracteriza por crisis recurrentes de disnea, tos y sibilancias, que varían en severidad y frecuencia de persona a persona. Las interacciones de estas características determinan las manifestaciones clínicas y la severidad del asma⁸.

1.2.2 Etiología

Se ha sugerido que los inicios del asma en una persona se originan en edades tempranas de la vida y su expresión depende de dos factores: factores innatos, de la persona, generalmente son genéticos, y factores ambientales, que ocurren en un momento crucial del desarrollo del sistema inmune. Entre los factores innatos se encuentran la disposición inherente de aumentar la producción de IgE específica

para factores ambientales comunes conocida como atopía, así como la alergia que lleva a una respuesta exacerbada del sistema inmune a sustancias externas y pueden provocar manifestaciones clínicas como inflamación^{7,9}. Se han propuesto dos factores ambientales que tienen gran importancia en el desarrollo, persistencia y, posiblemente, severidad del asma: alérgenos transportados por el aire y las infecciones respiratorias virales⁹.

Algunas causas y desencadenantes de un ataque asmático son comunes a todas las personas que sufren la enfermedad, pero hay también diferencias individuales según el fenotipo que se presente⁸.

1.2.3 Epidemiología

El asma es una enfermedad que afecta aproximadamente a 235 millones de personas en el mundo, siendo uno de los padecimientos no contagiosos más comunes entre niños⁸. La Organización Mundial de la Salud estima 250 000 muertes por asma al año en todo el mundo, afectando a todos los países sin importar su nivel de desarrollo económico, sin embargo, muchas de las muertes relacionadas con el asma se dan en países con mayor número de personas de bajos ingresos.

En los últimos años, instituciones médicas en México y el mundo han reportado un aumento en el número de pacientes con asma, y sugieren que esta tendencia aumentará gradualmente¹⁰. Muchos estudios realizados en México han revelado una cercana correlación entre el aire contaminado y el asma, registrando 300 nuevos casos en 2013¹¹. Los datos mundiales de mortalidad de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico ubica a México como el tercer país con mayor mortalidad por asma¹².

1.3 BRONCO-OBSTRUCCIÓN

La disminución del flujo aéreo es causada por una disminución del calibre de la vía aérea, en especial durante la espiración. La obstrucción de la vía aérea (también conocido como broncoespasmo) puede deberse a uno o varios de los siguientes factores: Contracción del músculo liso, aumento de la secreción de moco o

engrosamiento de la pared traqueobronquial^{9, 13, 14} (Fig. 2). Éste engrosamiento se debe a procesos de reparación, que es caracterizado por el incremento de músculo liso y fibrosis¹⁵.

La bronco-obstrucción es una característica del asma atópica y la causa principal es la hiperreactividad del músculo liso de la vía aérea, el músculo liso es capaz de contraerse ante diversos estímulos reduciendo el calibre de la vía aérea a medida que se contrae. Las causas que provocan la hiperreactividad pueden ser complejas, desde un mayor número de receptores a agentes contráctiles hasta cambios en las células del músculo liso (hipertrofia)^{16, 17}.

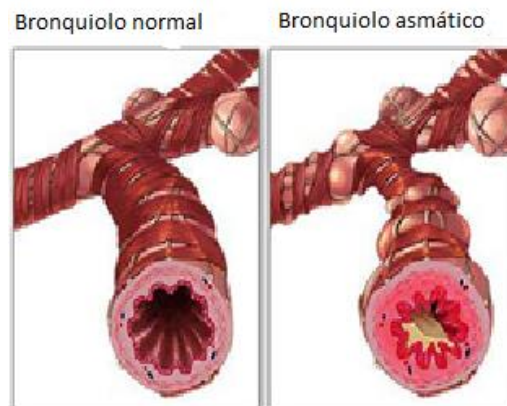


Figura 2. A la izquierda se observa un bronquio sano. A la derecha se puede observar un bronquio con obstrucción que se puede dar por la secreción de moco (mediante factores inflamatorios) y/o por el estrechamiento del músculo liso que rodea a la vía aérea. Modificado de University of Iowa Children's Hospital. 2015. www.uichildrens.org/childrens-content.aspx?id=228741.

1.4 HIPERREACTIVIDAD

La hiperreactividad bronquial está definida como un estrechamiento del calibre de las vías aéreas y se manifiesta como una respuesta de obstrucción exagerada a estímulos que no provoca ninguna reacción en individuos sanos, donde el mayor efector es el músculo liso. La hiperreactividad es una característica fundamental del asma, pero no todos los pacientes con episodios recurrentes de síntomas de asma tienen hiperreactividad y algunos que no tienen síntomas respiratorios muestran signos de hiperreactividad^{18, 19, 20}.

La hiperreactividad puede medirse usando varios broncoconstrictores. Estos pueden clasificarse en dos categorías: estimulantes directos, como histamina y metacolina que actúan directamente sobre el músculo liso, e indirectos por la estimulación de liberación de mediadores inflamatorios^{20, 21, 22, 23}. Esta respuesta se evalúa por medio de la dosis provocativa 20 (DP₂₀), que se refiere a la concentración del agente para inducir una disminución del 20% en la función pulmonar y el parámetro que evalúa directamente la obstrucción del flujo de aire es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁, por sus siglas en inglés), siendo que en sujetos sanos se requieren mayores concentraciones del compuesto para la disminución del 20% del FEV₁ (Fig. 3), mientras que en pacientes asmáticos estas concentraciones son menores^{24, 25}.

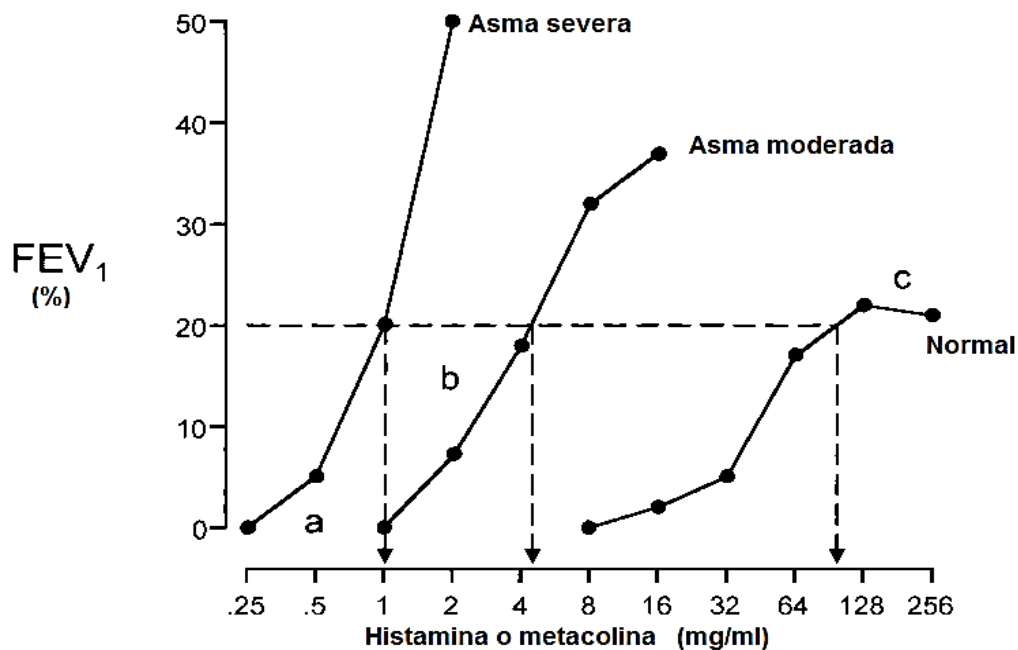


Figura 3. Curva de histamina ó metacolina. En individuos sanos la concentración necesaria para inducir una caída del 20% de la FEV₁ es mayor en comparación a la necesaria para provocar el mismo efecto en un individuo con asma. Mientras más crónica sea el asma la sensibilidad a la histamina o metacolina aumentará. Modificado de Partners health care. Asthma Center 2010. <http://www.asthma.partners.org/NewFiles/WoolcockWhatsAsthma.html>.

Algunos factores inflamatorios se han asociado a la hiperreactividad del músculo liso, así como células del sistema inmune, eosinófilos y células cebadas²³.

1.5 MÚSCULO LISO

El músculo liso está formado por una asociación de células alargadas generalmente dispuestas en capas alrededor de órganos huecos como el sistema respiratorio. Su contracción y relajación depende del sistema nervioso autónomo, endócrino y metabolitos locales^{26, 27}.

En cada célula del músculo liso se presentan dos tipos de filamentos: la miosina y la actina, que se unen a estructuras llamadas cuerpos densos. Cuando la MLCK (cinasa de la cadena ligera de miosina) fosforila a la cadena ligera de miosina se producen la contracción del músculo liso^{28, 29} (Fig. 4).

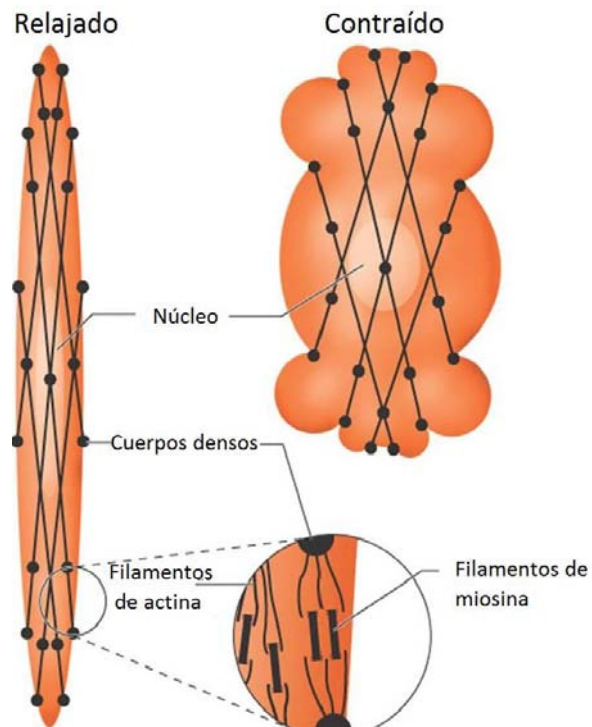


Figura 4. Contracción del músculo liso por el desplazamiento de filamentos de miosina sobre los microfilamentos de actina. Modificado de Vodenicharov A. Current basic and pathological approaches to the function of muscle cells. 2012. 346-361.

El músculo liso puede responder a lesiones y tiene orgánulos secretores (aparato de Golgi y retículo endoplásmico) bien desarrollados, por lo que son capaces de secretar colágena tipo III y IV, así como elastina, proteoglicanos y glucoproteínas².

1.5.1 Músculo liso de las vías aéreas

El músculo liso se encuentra desde la tráquea hasta los bronquiolos, su estado de contracción es modulado por una variedad de agonistas extracelulares que se unen a los receptores de membrana, provocando una reducción en el diámetro de la vía aérea³⁰. El sistema nervioso autónomo es un regulador de la contracción del músculo liso al liberar neurotransmisores excitadores e inhibidores, adicionalmente las células epiteliales, inflamatorias y aquellas que se localizan en la pared de la vía aérea son capaces de liberar mediadores como: histamina, endotelina, ATP y otros metabolitos que pueden modular la contracción a través de receptores de membrana^{31, 32, 33}.

Debido a que no se ha encontrado una función específica del músculo liso de la vía aérea algunos autores han especulado que puede ser una reminiscencia del desarrollo embriológico^{34, 35}. Sin embargo, la peristalsis producida por la contracción del músculo para asistir la exhalación, el movimiento de moco y el mantenimiento de la estructura de la vía aérea son posibles funciones de éste músculo^{36, 37, 38}, a pesar de no tener una función clara en la vía aérea su contracción es asociada con condiciones patológicas, por ejemplo, en el asma se han observado anomalías estructurales, morfológicas y funcionales en el músculo liso^{39, 40}.

1.5.2 Músculo liso vascular

El músculo liso vascular se encuentra rodeando los vasos sanguíneos, siendo uno de sus principales componentes. Lleva a cabo un papel importante en la vasoactividad, así como en la producción de matriz extracelular durante el desarrollo embrionario y la remodelación (en caso de lesiones) de la pared del vaso en edad adulta. También es en parte responsable de la regulación de la presión sanguínea y la redistribución del flujo sanguíneo y otras sustancias solubles^{41, 42}.

La contracción del músculo liso vascular suele ser prolongada y puede ser iniciada por estímulos mecánicos, eléctricos y químicos (norepinefrina, angiotensina, vasopresina, endotelina)⁴³.

Como en el caso del músculo liso de la vía aérea, Carrol⁴⁴ (1997) y Hong (2001)⁴⁵ han registrado cambios en el músculo liso de los vasos sanguíneos pulmonares en pacientes asmáticos.

1.6 CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL ASMA

La remodelación se refiere generalmente al engrosamiento de la pared de la vía aérea, así como diversas alteraciones incluyendo: anormalidades en el epitelio, engrosamiento de la membrana subepitelial, alteraciones en la deposición de matriz extracelular, angiogénesis e incremento en la masa del músculo liso, siendo una desregulación de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1/Th2) una de las principales causas. Los eosinófilos, interleucinas (IL), citocina Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), células cebadas y anticuerpos IgE son los principales factores inmunológicos encontrados en lavados bronqueoalveolares, causantes de inflamación^{46, 47, 48, 49}.

El epitelio respiratorio forma una barrera entre el medio externo y las vías aéreas. En el asma ésta barrera sufre daños y no tiene un buen aislamiento, contribuyendo a la hiperreactividad y liberación de citocinas inflamatorias por células del sistema inmune. Además las células epiteliales dañadas, liberan un gran número de factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que transforma las células epiteliales a mesenquimales que pueden diferenciarse en fibroblastos o miofibroblastos y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), así como acetilcolina, liberada por las terminaciones nerviosas, que puede contribuir a la remodelación al inducir el crecimiento de células del músculo liso, deposición de matriz extracelular y angiogenesis^{50,51,52,53}.

Las células cebadas también promueven la proliferación de fibroblastos ya que al degranularse liberan serina proteasas y triptasas, que son potentes estimulantes para proliferación, de la misma forma promueven la proliferación de células de músculo liso^{49,53,54}.

1.6.1 Remodelación en el músculo liso de las vías aéreas

El músculo liso de la vía aérea es el principal responsable de la obstrucción observada en el asma debido a que presenta hipercontractilidad que provoca una reducción en el calibre de la vía aérea y la hiperreactividad que a su vez se relaciona con los síntomas y con la severidad de la enfermedad^{55, 56, 57, 58}.

Aunque aún no está claro por qué el músculo liso es hiperreactor se ha intentado explicar por un aumento en las cadenas de miosina, mayor número de receptores a mediadores de contracción, aumento de la masa muscular, mayor liberación de mediadores contráctiles (principalmente factores inflamatorios de células cebadas y citocinas Th2, IL-5, IL-3) o baja liberación de mediadores relajantes^{59, 60, 61, 62}.

La célula del músculo liso no solo es un blanco pasivo para mediadores inflamatorios, sino que también puede considerarse como una célula inflamatoria, teniendo la capacidad de secretar citocinas y contribuir con la activación de células cebadas que al degranularse provocan contracción y daño a las células musculares^{63, 64, 65, 66}. Además el músculo liso de la vía aérea es capaz de remodelarse y proliferar en respuesta al daño y a la exposición a factores de crecimiento y mediadores liberados durante la inflamación alérgica tanto *in vitro* como *in vivo*, no obstante la relación inflamación-remodelación es compleja y no está completamente comprendida⁶⁷.

Los mecanismos de remodelación en el músculo liso de la vía aérea involucran hiperplasia e hipertrofia, así como deposición de matriz extracelular⁶⁸. La hiperplasia puede ser resultado de 3 factores: proliferación del músculo liso, reducción de la apoptosis o por migración y diferenciación de miofibroblastos a células musculares^{68, 69}. La hipertrofia está asociada a un aumento de la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), relacionado directamente con la hiperreactividad, aunque no es el único factor causante de ésta⁷⁰. Tanto la hiperplasia como la hipertrofia pueden depender en cierto grado de la matriz extracelular^{71, 72}.

La matriz extracelular es una estructura dinámica que rodea a las células del músculo constituida por depósitos de proteínas, incluyendo: fibronectina, elastina, laminina, colágena I, III, IV, V, producidas por los miocitos^{73, 74}. Las células del

músculo liso en asmáticos producen mayor cantidad de matriz y las proporciones de sus elementos se encuentran alterados, hay mayor deposición de colágena I, fibras elásticas y menor producción de laminina $\alpha 1$, también se encuentra mayor cantidad de laminina que es depositada probablemente por el epitelio o miofibroblastos. Es importante señalar que las células musculares pueden desdiferenciarse a miofibroblastos teniendo mayor capacidad de secretar matriz extracelular^{75, 76}. El crecimiento anormal de la matriz extracelular se debe a factores transformantes como TGF- β y mediadores inflamatorios, incrementados en el asma por células cebadas y del músculo liso^{64, 77}.

La deposición alterada de proteínas de matriz extracelular puede alterar las propiedades mecánicas (como la contracción del músculo liso), así como la regulación de la supervivencia, migración, secreción de citocinas y crecimiento de las células de músculo liso^{67, 78, 79}.

Se ha reportado que la inflamación no controlada está relacionada con el grado de remodelación de las vías aéreas, debido a constantes procesos de daño/reparación^{80, 81}. Sin embargo recientes estudios han demostrado que la edad (individuos jóvenes y maduros) no parece estar relacionada con un incremento en la deposición de colágena subepitelial ni de matriz extracelular en el músculo liso en el asma (siendo mayor que en individuos control), pero sí con el engrosamiento de la vía aérea^{73, 82}.

1.6.2 Remodelación en el músculo liso vascular

Muchos mediadores y factores de crecimiento que son liberados en la inflamación de la vía aérea en el asma como la histamina, prostaglandinas, leucotrienos y citocinas están involucrados en respuestas de angiogenesis, vasodilatación y remodelación de la vasculatura bronquial⁸³. VEGF es una citocina que induce la angiogénesis y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos, siendo el músculo liso en estado de remodelación liberador de grandes cantidades de VEGF^{84, 85}.

Como parte del proceso de remodelación de los vasos sanguíneos en el asma se ha registrado un aumento en el tamaño y en el número de vasos por área^{85, 86}, aunque otras investigaciones no han encontrado angiogenesis⁸⁷.

Cada componente de la remodelación vascular es una respuesta a mediadores inflamatorios y factores de crecimiento. Por sí mismos los vasos sanguíneos actúan como entrada para células inflamatorias y por ello modifican y autorregulan la función endotelial⁸⁸.

La acumulación anormal de matriz extracelular es un factor importante en las patofisiología de las lesiones vasculares, provocando el engrosamiento del vaso sanguíneo. La primera respuesta de la remodelación es la proliferación y migración de células de músculo liso vascular hacia la túnica íntima donde comienzan a sintetizar matriz extracelular formando una capa llamada "neoíntima" rica en laminina (Fig. 5)^{88,89}.

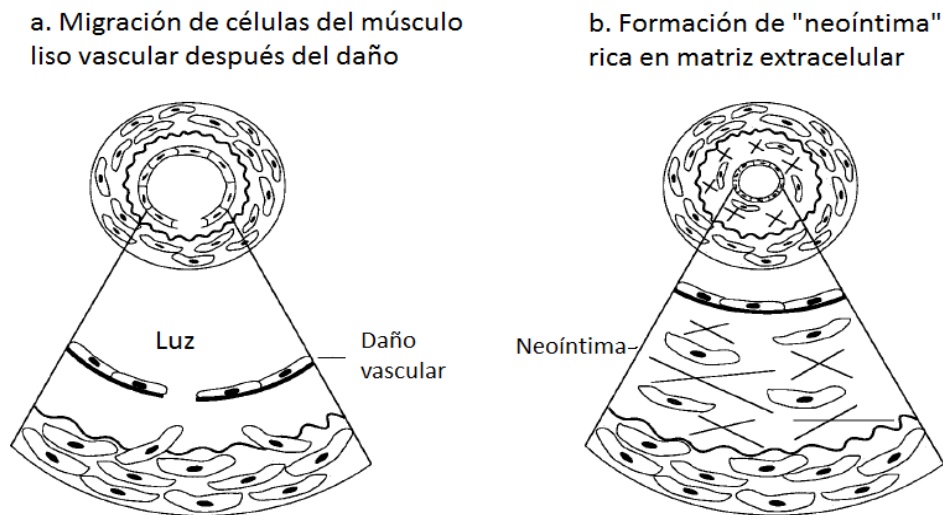


Figura 5. Remodelación de un vaso sanguíneo. a) el daño induce que células del músculo liso migren a la capa íntima. b) Las células del músculo liso comienzan a secretar matriz extracelular formando una capa neoíntima. Modificada de Rouslahti E. Am Soc Clin Invest. 1997; 99 (6): 1149-1152.

1.7 Laminina e integrina

En el asma las células del músculo liso de la vía aérea, así como del músculo liso vascular producen una mayor cantidad de matriz extracelular, que se caracteriza por contener proporciones alteradas de las proteínas que la componen^{75, 76, 88}. La

laminina es una proteína heterotrimérica de ~400 kDa formada por cadenas α , β y γ que tienen regiones de unión específicas a otras proteínas como colágeno, integrinas, distroglicano, etc. (Fig. 6a), cada cadena de la laminina puede tener de 1 a 5 variantes genéticas que modifican su nombre y unión a otras proteínas⁹⁰. Contribuye en la formación de matriz extracelular y tienen un papel importante en la morfogénesis y homeostasis del tejido al regular funciones como la adhesión celular, migración y señalización de la matriz extracelular a la célula^{90,91}. Estos procesos se llevan a cabo por la capacidad que tienen a unirse a las membranas celulares a través de las integrinas⁹².

Las integrinas son glucoproteínas transmembranales compuestas por una subunidad α y una β que pesan de 90 a 160 kDa, son las principales proteínas receptoras utilizadas en la célula para unirse y responder a la matriz extracelular, regulando procesos celulares como migración, fenotipo celular y apoptosis. La subunidad β se ancla directa o indirectamente al citoesqueleto, principalmente a los filamentos de actina, mientras que la subunidad α se une a otros componentes de la matriz extracelular (Figura 6b)⁹³.

Se han descrito 18 subunidades α y 8 de la subunidad β en mamíferos, cada una producida por un gen diferente de la familia de genes ITG (genes de integrinas). Su combinación determina la unión a otras proteínas. Entre las integrinas receptoras para laminina se encuentran integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha7\beta1$ y se anclan a regiones específicas en la laminina (Figura 6a)^{93, 94,95}.

Particularmente la integrina $\alpha6$ es expresada en epitelios, fibroblastos, así como en el desarrollo embrionario del pulmón y en músculo liso de vasos sanguíneos^{95, 96}.

La unión laminina-integrina tiene un papel muy importante en el músculo liso, por ejemplo, la unión laminina-integrina $\alpha7$ facilita un fenotipo contráctil en los miocitos de la vía aérea^{96,97}.

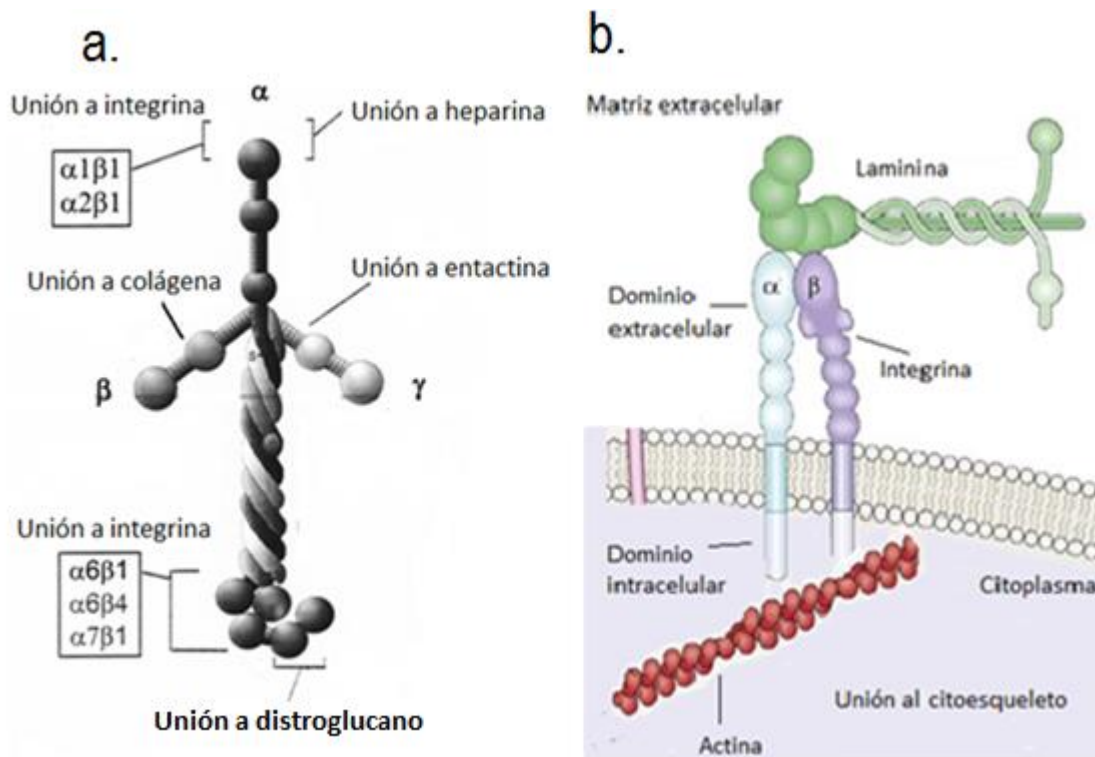


Figura 6. La laminina (a) es una proteína trimérica con regiones específicas para su unión con integrinas u otras proteínas de matriz extracelular. La interacción de los receptores celulares integrinas con la laminina (b) permite la regulación de diversos procesos en la célula. Modificado Cognato H, Yurchenco, P. Wiley Liss, 2000; 218: 213-34.

1.7.1 El papel de la laminina y las integrinas en el músculo liso en el asma

Las alteraciones en la matriz extracelular durante el asma potencialmente pueden alterar el desarrollo de las características del músculo liso, no obstante, las integrinas también tienen una fuerte influencia en este aspecto⁵⁸.

En el asma las células del músculo liso presentan hipertrofia, así como una reducción en la apoptosis, que es provocada en parte, por componentes de la matriz extracelular como fibronectina, laminina y colágena, que promueven fuertes señales de supervivencia en las células del músculo liso de la vía aérea mediante las integrinas^{70, 71, 72}. Estudios más específicos han demostrado que la aplicación exógena de laminina-1 mantiene un fenotipo contráctil en el músculo liso de la vía aérea, mientras que la producción endógena de laminina-2 está involucrada con la

maduración, supervivencia y fenotipo hipercontráctil del músculo liso^{78, 98, 99}. Las integrinas son fundamentales para que estos procesos se lleven a cabo, por ejemplo la integrina $\alpha 7\beta 1$ es necesaria para mantener el fenotipo contráctil en el músculo liso de la vía aérea que es inducido por laminina⁹⁷.

La interacción laminina-integrina $\alpha 7\beta 1$ también es requerida para promover la acumulación de proteínas antiapoptóticas y la activación de vías de señalización que promueven la maduración de las células del músculo liso de la vía aérea¹⁰⁰.

La angiogénesis depende de la conexión entre laminina e integrina, donde la principal integrina involucrada es αv siendo mayormente expresada durante lesiones inflamatorias¹⁰¹. En el músculo liso vascular las integrinas $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ promueven un fenotipo contráctil, uniéndose a laminina, mientras que la integrina $\alpha 4\beta 1$ promueve la diferenciación^{102, 103}. Algunos estudios en músculo liso arterial sugieren que la laminina promueve un fenotipo contráctil al igual que en el músculo liso bronquial^{104,105}.

1.7.2 Laminina-integrina $\alpha 6$

La integrina $\alpha 6$ es una proteína de 120 KDa y puede formar heterodímeros con la subunidad $\beta 1$, para la cual sus ligandos son laminina y VEGF, o bien con una subunidad $\beta 4$ donde tiene a laminina como único ligando^{106, 107}.

La integrina $\alpha 6$ es altamente expresada en células del músculo liso de la vía aérea que se encuentran en procesos de maduración. En músculo liso vascular se ha encontrado en asociación con $\beta 4$ y $\beta 1$ ^{96, 97, 102}. Por otra parte, el incremento en la expresión de laminina, un componente de la matriz extracelular, es asociado con el músculo liso de la vía aérea en el asma y con la remodelación de vasos sanguíneos^{89, 100}. No se han realizado mayores estudios sobre la expresión de integrina $\alpha 6$ en asma tanto en músculo liso de la vía aérea o vascular.

1.8 Modelo de asma en el cobayo

El cobayo es el modelo *in vivo* más utilizado preferencialmente en la investigación del asma alérgica, ya que desde la anatomía de las vías aéreas hasta la respuesta inflamatoria es altamente similar a la observada en humanos. Los cobayos

presentan bronco-obstrucción después de un reto antigénico con ovoalbúmina (OVA), así como hiperreactividad y la remodelación que se observa en el asma¹⁰⁸. Se han reportado que algunos cobayos no desarrollan respuestas obstructivas después de uno o varios retos antigénicos con OVA, éstos son conocidos con el nombre de cobayos no respondedores (NR)^{109, 110}. Las características inmunológicas de los cobayos NR varían en gran medida en comparación con los cobayos respondedores, conocidos como modelo de asma, (tabla 1), siendo una de las principales características la presencia de células Th1 y T reguladoras en lugar de Th2 características del asma, y de neutrófilos en vez de eosinófilos¹¹⁰.

	Modelo de asma		No respondedor	
	Agudo	Crónico	Agudo	Crónico
IgE	Sí	Sí	No	No
IgG	Sí	Sí	Sí	Sí
Linfocitos Th1	No	No	No	Sí
Linfocitos Th2	Sí	Sí	No	No
Linfocitos Th17A	Sí	Sí	No	No
Linfocitos Th3	No	No	Sí	Sí
Linfocitos Tr1	No	No	Sí	No
Linfocitos Treg FOXP₃⁺	No	No	Sí	Sí
IL-4, IL-5	Sí	Sí	No	No
IL-10	Sí	Sí	Sí	Sí
IL-13	Sí	Sí	No	No
IL-17A	Sí	Sí	Sí	No
TNF-α	Sí	Sí	No	No
TGF-β	Sí	Sí	No	Sí
Eosinofilia	Sí	Sí	No	No
Neutrofilia	No	No	Sí	Sí

Cuadro 1. Principales diferencias en los cobayos modelo de asma y cobayos "no respondedores al reto antigénico". En un estudio reciente se han establecido las diferencias inmunológicas de ambos modelos. El modelo agudo corresponde a 3 retos antigénicos y el crónico a 12 retos antigénicos. Ramos P, et al. 2013. Exp Lung Research, 39. 136-145.

Otras características de los cobayos NR son la presencia de fibrosis de la vía aérea y de hiperreactividad a la histamina, aunque la hiperreactividad se pierde en los

cobayos NR crónicos. En otros estudios se sugiere que la hiperreactividad se puede dar en ausencia de infiltrados inflamatorios en la vía aérea, y ser producida por otros factores, por ejemplo, por laminina e integrinas⁹⁷.

2. JUSTIFICACIÓN

El asma es uno de los desórdenes funcionales más importantes de las vías aéreas que se caracteriza por obstrucción transitoria, inflamación y una gran reactividad que se desarrolla rápida e intensamente conocida como **hiperreactividad de las vías aéreas**. Evidencias clínicas y experimentales han mostrado que la hiperreactividad es un proceso multifactorial donde diferentes mecanismos actúan en la vía aérea, pero aún se desconoce el mecanismo preciso que la induce. De manera interesante diversos estudios señalan que algunos individuos que no padecen de ninguna enfermedad ó síntomas respiratorios también presentan hiperreactividad de las vías aéreas. Esta condición ha sido referida como **hiperreactividad asintomática** y su importancia clínica es motivo de debate; sin embargo, se ha sugerido que puede preceder a la aparición de asma ^{111, 112, 113, 114, 115, 116, 117}.

En nuestro laboratorio hemos observado que existen cobayos respondedores y no respondedores al reto antigénico (NR), éstos últimos muestran las mismas características que la hiperreactividad asintomática (no presentan bronco-obstrucción, pero sí hiperreactividad), por lo que podrían representar un buen grupo de estudio de ésta condición descrita en humanos.

Debido a que el músculo liso es el tejido más importante en el desarrollo de la hiperreactividad y a que la laminina, una proteína componente de la matriz extracelular, mantiene el fenotipo contráctil del músculo liso, este proyecto se dirige a evaluar si la expresión de laminina y la subunidad $\alpha 6$ de integrina se altera en músculo liso de las vías aéreas y comparamos dicha expresión con el tejido arterial intrapulmonal, que se caracteriza por ser hiperproliferante en el asma, en cobayos del modelo de asma y NR.

3. HIPÓTESIS

Si la expresión de laminina tiene alguna relación en la contractilidad y proliferación del músculo liso, entonces su expresión será distinta al comparar cobayos del modelo de asma con NR crónicos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la expresión de laminina e Integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial y arterial intrapulmonar de cobayos modelo de asma y NR.

Objetivos particulares

En los cobayos del modelo de asma y NR agudos y crónicos:

- Determinar la expresión de laminina y de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial mediante inmunohistoquímica.
- Determinar la expresión de Integrina $\alpha 6$ y laminina en el músculo liso arterial intrapulmonar mediante inmunohistoquímica.

5. MATERIAL Y MÉTODO

El uso de cobayos es común como un modelo animal en el estudio del asma alérgica, ya que el cobayo exhibe cambios inflamatorios, funcionales y estructurales similares a los que ocurren en las vías aéreas de los pacientes asmáticos. Así mismo la respuesta asmática puede ser medida y la hiperreactividad puede ser observada¹⁰⁸.

Animales

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc:DH proporcionados por Harlan México, y fueron resguardados en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” INER. Se mantuvieron en condiciones de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, con una humedad de 50 a 60%, aire filtrado y 12/12 horas de ciclo luz-oscuridad.

Las condiciones de manejo de los animales estuvieron apegadas a los protocolos aprobados por el Comité científico y bioético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Modelo experimental

Para este trabajo se utilizaron 24 cobayos HsdPoc:DH, que fueron divididos en 2 grupos: 1) Animales agudos y 2) Animales crónicos, cada grupo fue dividido a su vez en 3 grupos más, los cuales fueron controles, modelos de asma y no respondedores, donde cada grupo constó de 4 animales.

Día 1: Sensibilización

Los cobayos recibieron una combinación de OVA 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluida en solución salina fisiológica (SSF), con hidróxido de aluminio 1 mg/mL de SSF, en total se administró 1 mL de la solución anterior que fue dividida en inyecciones de 0.5 mL por vía intraperitoneal y 0.5 mL por vía subdérmica. Los animales control recibieron de SSF en lugar de la combinación OVA e hidróxido de aluminio.

Día 8: Refuerzo antigénico

A los ocho días de haber sensibilizado, se realizó el refuerzo antigénico, donde se administraron 20 mL de OVA (3mg/mL SSF) durante 5 minutos mediante nebulización. Las nebulizaciones fueron producidas por un nebulizador US-1 Bennett (flujo 2mL/minuto), Burkard Manufacturing. A los animales control se les nebulizó con 20 mL de SSF durante 5 minutos.

Día 15: Reto antigénico

A partir del día 15 se iniciaron los retos antigénicos cada 10 días. Para el primer reto (15 días) se nebulizó a los animales con OVA (1mg/mL) durante 1 minuto. En los siguientes retos se nebulizaron con OVA (0.5 mg/mL) durante otro minuto. Para los animales control se nebulizó con SSF durante 1 minuto. Se realizaron 3 retos para animales agudos (35 días) y 12 retos para animales crónicos (125 días) (Fig. 7). Cinco minutos antes y durante 1 hora posterior al reto antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica.

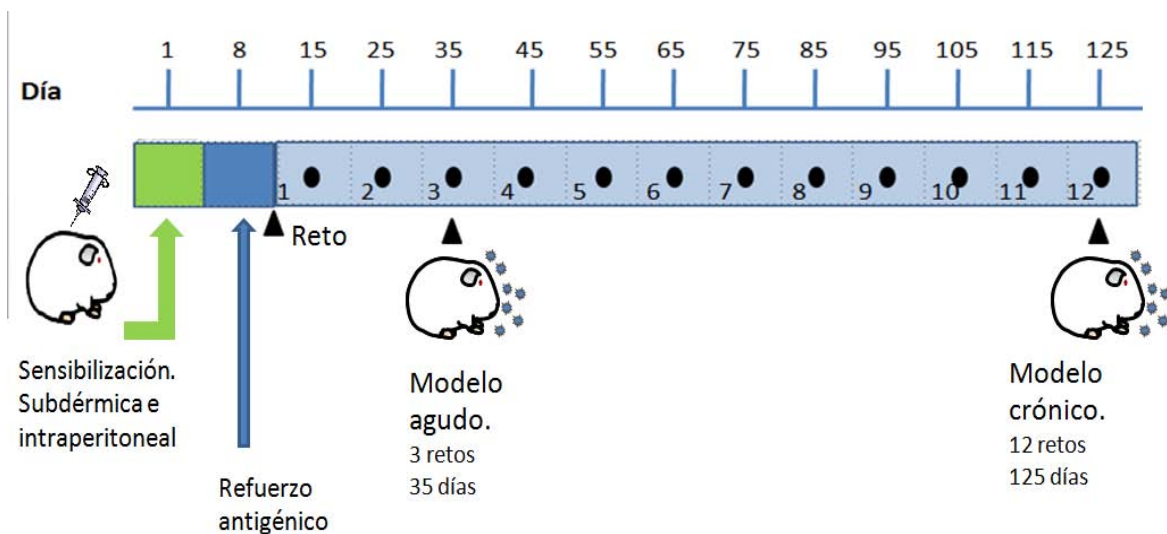


Figura 7. Modelo experimental. En el día 1 se inició la sensibilización de los cobayos, 8 días después se realizó un refuerzo antigénico, al día 15 se llevó a cabo el primer reto antigénico y posteriormente cada 10 días. En la imagen se puede observar el número de reto antigénico (barra azul).

Pletismografía barométrica

Para medir la función pulmonar de los cobayos durante los retos se utilizó un pletismógrafo barométrico BuxcoElectronics, Inc. E.U., que es utilizado para medir los cambios de volumen dentro de la cámara y los compara con una cámara de referencia mediante un transductor SCXL4DNSenSym conectado a un amplificador (Fig. 8).

La señal generada fue procesada y analizada mediante un programa de cómputo (BuxcoBiosistemXAv1.1). El programa fue calibrado para medir solamente cambios en el volumen mayores a 1 mL disminuyendo la probabilidad de registrar artefactos.



Figura 8. Equipo de pletismografía barométrica. Con éste equipo es posible medir la función pulmonar de los cobayos y observar su respuesta bronco-obstruccion. Modificada de Chavez-Alderete J., 2007. Tesis Doctoral Efecto paradójico del salbutamol sobre las vías aéreas en un modelo de intoxicación aguda por organofosforados en cobayos. UNAM, México D. F.

El índice de bronco-obstruccion (iB) 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 dentro de los pulmones adquiere más volumen al calentarse y los sensores de la cámara de pletismografía detectan el cambio en el volumen como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio pues disminuye conforme el animal exhala el aire, bajando el volumen del aire dentro de la cámara y este proceso se registra como una disminución en la presión. De ésta forma el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, si no que puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y la espiración en el tiempo (Fig 9). Para evaluar la bronco-obstrucción el programa utiliza la fórmula: $\dot{I}B = ((Te - Tr) / Tr) (PFE / PFI)$

Donde:

ÍB: Índice de bronco-obstrucción.

Te: Tiempo total espiratorio (s)

Tr: Tiempo total de relajación (s)

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

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

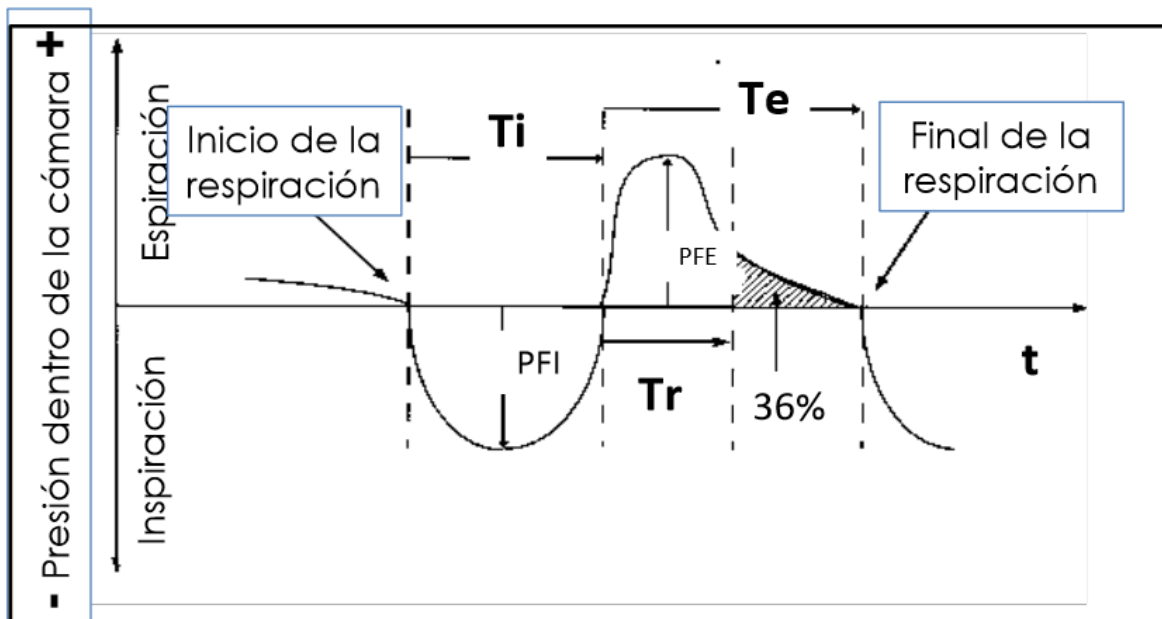


Figura 9. Representación de los cambios de presión en un ciclo respiratorio en una cámara de pletismografía barométrica.

Reactividad de las vías aéreas

Para evaluar la reactividad de las vías aéreas se realizaron curvas de histamina. La reactividad fue evaluada en el día 35 para los animales agudos (3 retos) y en el día 125 en animales crónicos (12 retos), para esto los cobayos se introdujeron en el pletismógrafo.

Inicialmente se obtuvieron valores basales de \dot{V}_B , posteriormente se nebulizó a los animales por 1 minuto con diferentes dosis de histamina en un rango de 0.013-3.2 mg/mL, dejando un tiempo de 10 minutos entre cada dosis de histamina. Para cada dosis de histamina se obtuvieron los valores de \dot{V}_B durante 5 minutos y se obtuvo el valor promedio, la curva de histamina terminó cuando cada cobayo triplicó la \dot{V}_B basal. Al valor de histamina que provoca el aumento al triple de \dot{V}_B se le llama dosis provocativa 200 (DP_{200}).

Posteriormente se esperó a que la bronco-obstrucción disminuyera al \dot{V}_B basal, una vez alcanzado este valor se retó durante 1 minuto con OVA (0.5 mg/mL) mediante nebulización. Para los cobayos control se utilizó SSF en lugar de OVA.

Después de 3 horas se inició una segunda curva de histamina siguiendo el mismo procedimiento que anteriormente se describió (Fig. 10).

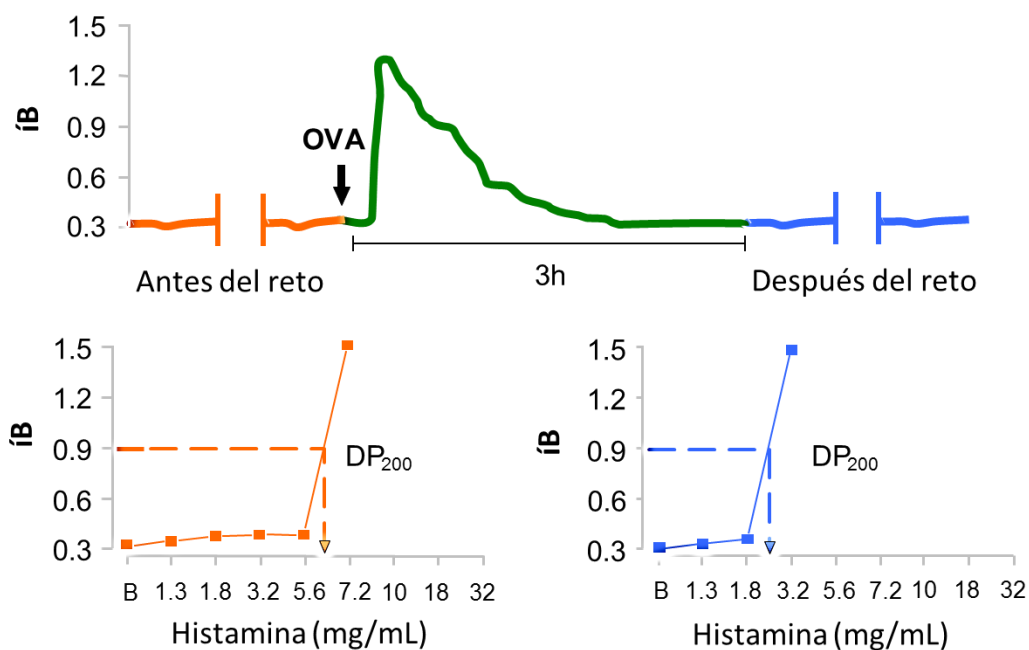


Figura 10. Curvas de histamina (eje "x" concentración de histamina administrada, eje "y" índice de bronco-obstrucción). En naranja se observa la primera curva de histamina, posteriormente (en verde) se observa la administración de OVA, finalmente se realizó una segunda curva de histamina (azul).

La segunda curva de histamina se realiza para asegurarse de que la hiperreactividad de las vías aéreas es una respuesta específica al reto previo con OVA.

Al final se obtuvieron 2 grupos de cobayos: cobayos agudos de 35 días (3 retos) y cobayos crónicos de 125 días (12 retos). Cada grupo tuvo 4 cobayos controles, 4 cobayos modelo de asma y 4 cobayos NR (Figura 10).

Obtención de muestras de pulmón

Una vez que se obtuvieron los registros de fB y se separaron los grupos de cobayos respondedores, no respondedores y controles, se procedió a obtener muestras de pulmón. Las muestras fueron colocadas en formaldehído y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Los bloques fueron cortados a la altura del lóbulo medio del pulmón en secciones transversales con 4µm de grosor y colocados en portaobjetos (Biocare medical, Kling-On slides). Se obtuvieron 4 cortes (laminillas) por cobayo.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que utiliza la aplicación de anticuerpos para determinar la distribución y localización de un antígeno determinado en el tejido sano o enfermo. Es una herramienta útil en la diagnosis, así como en la investigación¹¹⁸.

Los procesos de fijación e inclusión en bloques de parafina pueden alterar la conformación de las proteínas de los tejidos, por lo que se realizó una recuperación antigénica mediante la técnica de calor utilizando buffer de citratos PH 6.0.

Se utilizó el kit para inmunohistoquímica VECTASTAIN: Universal Quick kit que contiene suero bloqueador de caballo, anticuerpo secundario universal y el complejo preformado estreptavidina/peroxidasa. Con este kit se realizó el método indirecto de inmunohistoquímica.

Para bloquear la reacción de la peroxidasa endógena se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y posteriormente suero bloqueador del kit. Posteriormente se agregó anticuerpo anti-integrina α6 ó anti-laminina (R&D systems envase con

100µL) a una concentración 1:50 (1µL de anticuerpo en 50 µL de suero bloqueador de caballo).

Se agregó una gota de anticuerpo (suero) secundario universal (incluido en el kit VECTASTAIN) y finalmente se colocó una gota del complejo preformado streptavidina/peroxidasa que se une al anticuerpo secundario.

Una vez formado el complejo anticuerpo primario, anticuerpo secundario y enzima peroxidasa, se adicionó la solución sustrato AEC (VECTOR laboratories AEC peroxidase substrate) que contiene una solución buffer, AEC (3-amino-9-etilcarbazol) y peróxido de hidrógeno, siguiendo el protocolo del producto.

El H₂O₂ funciona como sustrato mientras que el AEC produce un producto de color rojo en la presencia de la enzima peroxidasa.

Finalmente, los cortes histológicos de pulmón se contratiñeron con hematoxilina (VECTOR hematoxylin H-3401), y se montaron con medio semipermanente para inmunohistoquímica EcoMount (Biocare Medical).

Observación en el microscopio

En cada cobayo se realizaron inmunohistoquímicas en cada una de los cortes obtenidos tanto para integrina α6 como para laminina (Fig. 11). Y de cada uno se analizaron en el microscopio 4 bronquios (a su vez dividido en 4 secciones) y 4 arterias intrapulmonares (también divididos en 4 secciones). Los bronquios se observaron en un microscopio óptico Zeiss Axio Lab A1 a un aumento de 40X, y se tomaron microfotografías de los bronquios y de las arterias con una cámara axioCam ERc5s incluida en el microscopio.

Las imágenes en tiempo real y las microfotografías se observaron mediante el programa Zen wide field.

Análisis semicuantitativo

La inmunohistoquímica se considera como una tinción especial ya que tiñe sólo en los sitios donde se encuentra la molécula buscada. Es necesario saber qué tanta marca hay. Para ello se empleó un método semicuantitativo, donde se midió la intensidad de marca y se comparó con una escala determinada de intensidad.

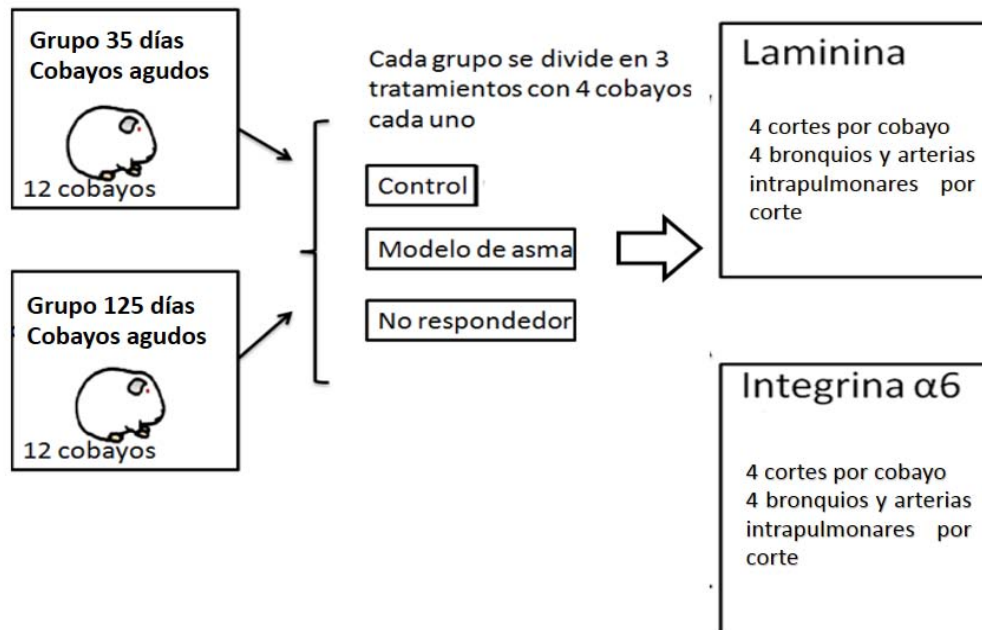


Figura 11. Se tuvieron 2 grupos. Un grupo agudo de 3 retos antigénicos (35 días) y un grupo crónico con 12 retos antigénicos (125 días). Cada grupo se dividió en 3: controles, modelo de asma y no respondedores, con 4 cobayos cada uno. En cada cobayo se determinó la expresión de laminina e integrina $\alpha 6$. Se midió la intensidad de marca de laminina e integrina $\alpha 6$ de 4 bronquios y 4 vasos sanguíneos por cobayo.

El programa ImageJ 1.48v fue calibrado con una escala de grises, dando a cada variación de tono un valor numérico de 0 a 255, donde blanco corresponde a un valor de 255 y negro corresponde a 0. Una vez calibrado el programa se analizó la imagen del bronquio o arteria, fue necesario cambiar la imagen a blanco y negro, posteriormente se seleccionaron distintas regiones del músculo liso bronquial o vascular y el programa determinó el valor numérico en la escala correspondiente.

Análisis estadísticos

Se analizaron 4 bronquios y 4 arterias intrapulmonar de cada cobayo, se midió la intensidad de varias zonas y se obtuvo un promedio.

Los promedios obtenidos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad 5. Se aplicó una prueba ANOVA de 1 vía, para comparar todos los tratamientos (controles, modelo de asma y NR) y la prueba postHoc Bonferroni, la significancia se estableció con $p < 0.05$.

Se hizo una comparación de la intensidad de marca de inmunohistoquímica entre cobayos controles agudos y crónicos, modelo de asma agudos y crónicos y NR agudos contra NR crónicos. Una segunda comparación se hizo dentro de cada grupo, es decir se comparó la intensidad de marca entre el control agudo, el modelo de asma agudo y el NR agudo, lo mismo se hizo para el grupo de los cobayos crónicos. Estas comparaciones se realizaron para medir la intensidad de marca de laminina y para la intensidad de marca de la integrina $\alpha 6$ en músculo liso bronquial y arterial intrapulmonar (Fig. 12).

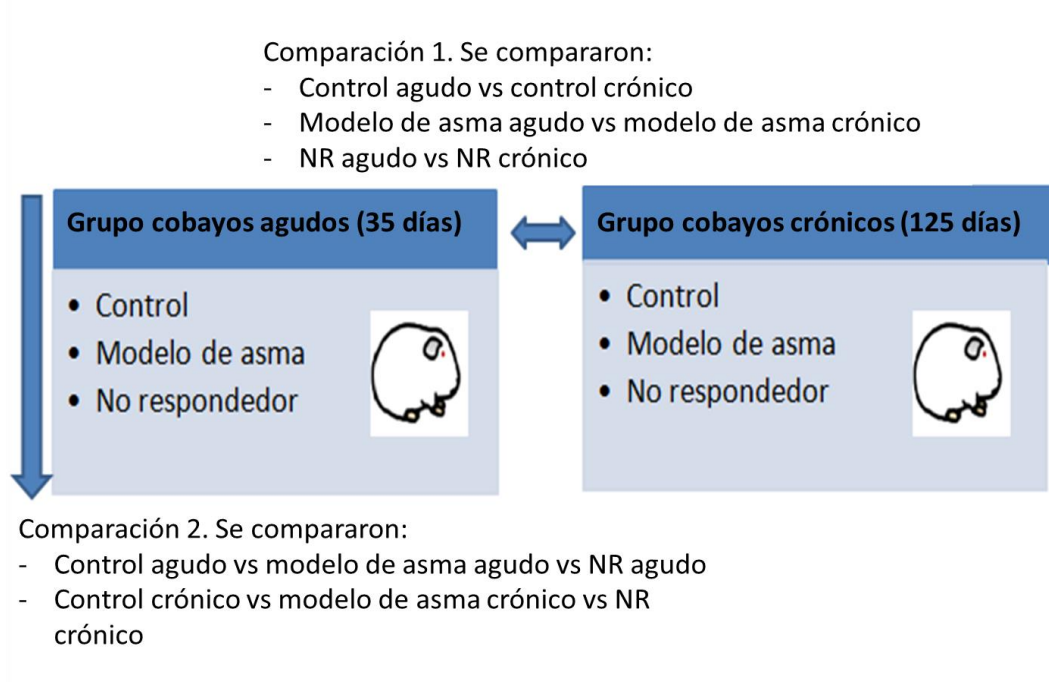


Figura 12. Comparación de los grupos establecidos. Comparación 1: se compararon la intensidad de marca de laminina e integrina 6 de los cobayos agudos contra los cobayos crónicos para determinar si el número de retos tenía algún efecto en su expresión. Comparación 2: dentro de cada grupo (agudo o crónico) se compararon los cobayos control, modelo de asma y NR para determinar si había variaciones en la expresión.

Finalmente se construyó un análisis de correlación entre la integrina $\alpha 6$ y laminina. Uno correspondió a la correlación laminina-integrina $\alpha 6$ del músculo liso bronquial y la segunda a músculo liso vascular. Las gráficas se construyeron en el programa SLIDE.

6. RESULTADOS

Obstrucción inducida por OVA

Una hora después del reto antigénico por la exposición a OVA se evaluó la bronco-obstrucción en cobayos agudos (3 retos) y crónicos (12 retos). El promedio del IB (Figura 13) muestra que sólo los cobayos del modelo de asma muestran un aumento en la obstrucción.

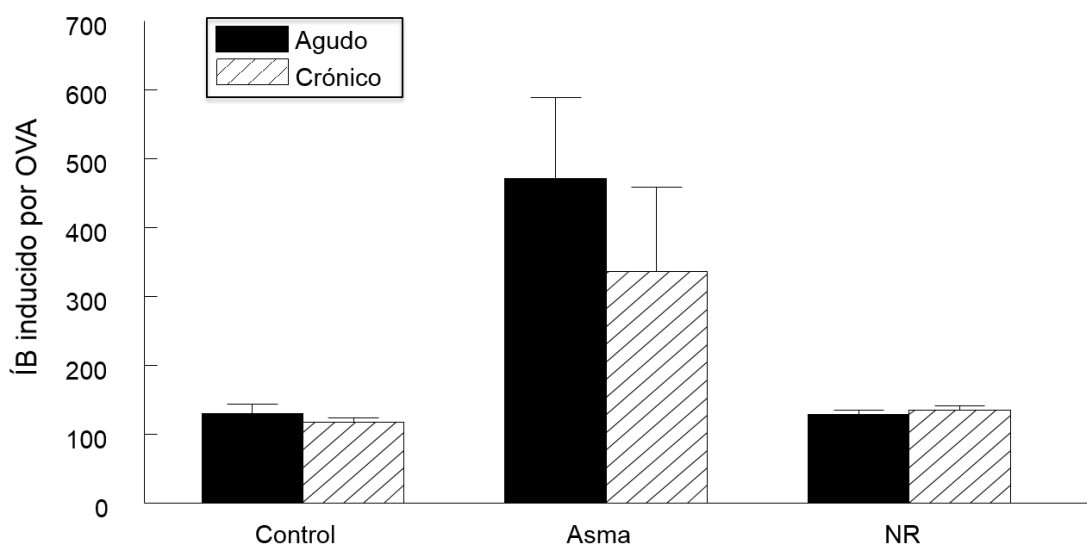


Figura 13. Bronco-obstrucción inducida por OVA en cobayos. Los valores de IB fueron significativamente diferentes entre los cobayos del modelo de asma y los cobayos del grupo NR y grupos controles ($p < 0.01$). A los cobayos controles se les nebulizó con SSF.

Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso bronquial

En una micrografía en detalle del músculo liso bronquial se observó que la laminina se expresa principalmente en el intersticio que rodea al músculo liso (color rojo, Fig. 14), encontrándose en todos los grupos estudiados (Fig. 15).

La expresión de laminina en los cobayos tanto agudos (3 retos) como crónicos (12 retos) del modelo de asma y controles es visualmente muy similar, así mismo con los cobayos NR agudos. Los cobayos NR crónicos mostraron un aumento en la marca de laminina, tanto en intensidad como en distribución (Fig. 15).

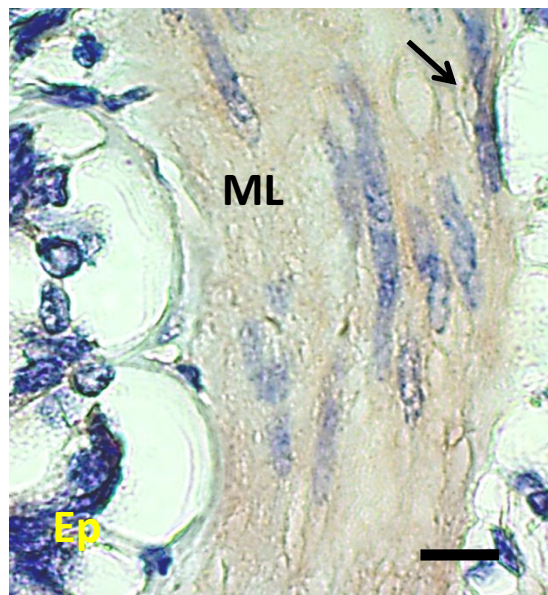


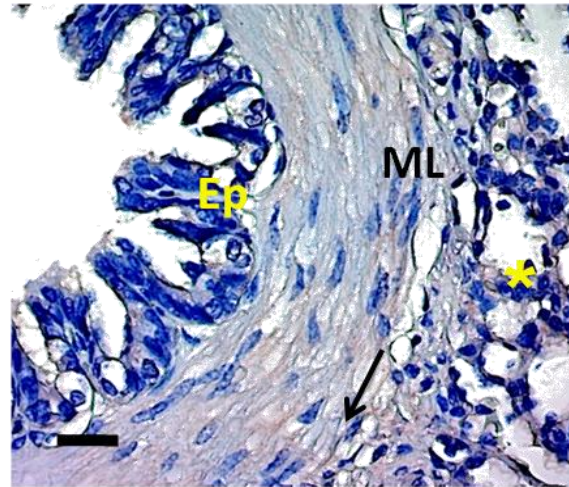
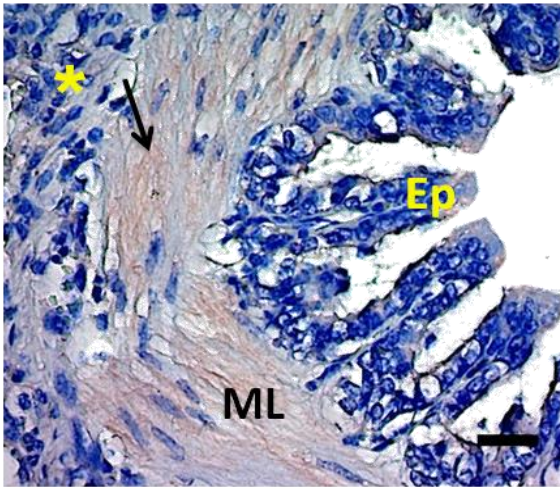
Figura 14. Detalle del músculo liso bronquial. La laminina en el músculo liso (ML) parece estar envolviendo a las células musculares (flecha negra). Línea de escala igual a 200 µm. Aumento 100x. Ep (epitelio).

Para determinar si las diferencias observadas mostraban una diferencia estadísticamente significativa se realizó un estudio semicuantitativo donde se midió la intensidad de marca inmunológica de la laminina en intersticio del músculo liso. Los grupos del modelo agudo no mostraron diferencias significativas en la expresión de laminina entre sí. Los cobayos NR crónicos mostraron un aumento significativo ($p < 0.001$) en la expresión de laminina respecto a los grupos controles y modelo de asma crónico al igual que respecto a los cobayos NR agudos (Fig. 16).

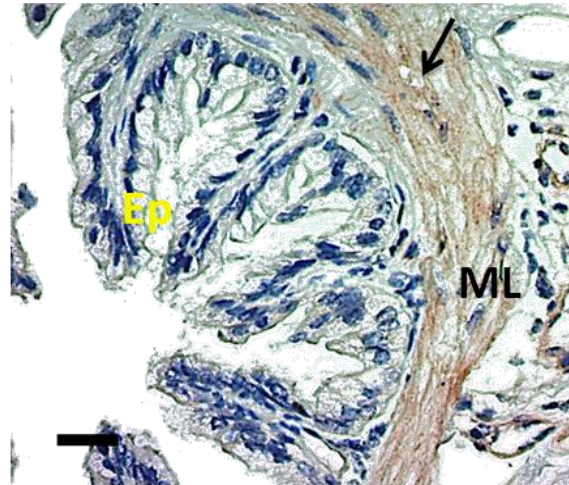
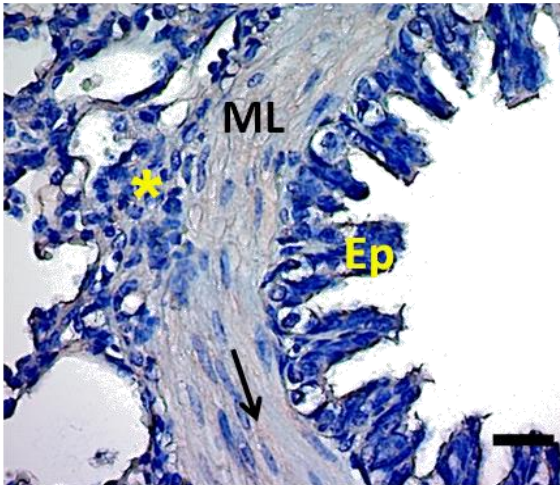
Grupo agudo (3 retos)

Grupo crónico (12 retos)

Control



Modelo de asma



No respondedor

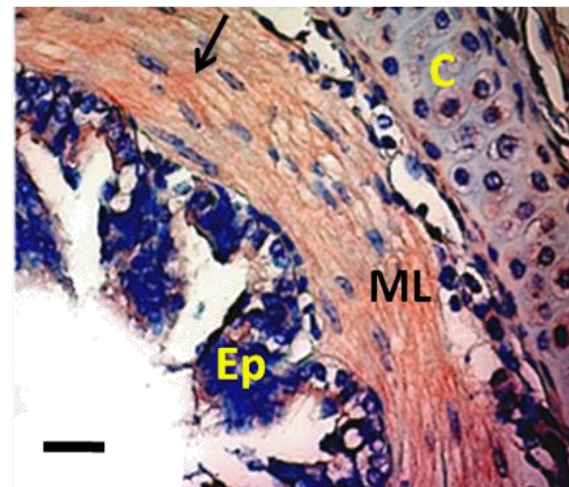
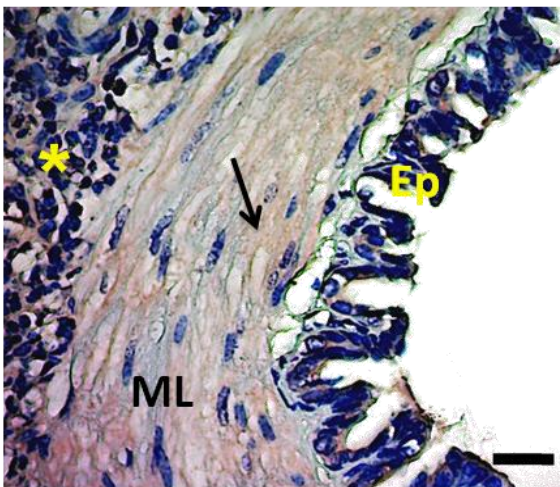


Figura 15. Marca de laminina **en el intersticio del** músculo liso bronquial. Del lado izquierdo se encuentran los cobayos agudos, a la derecha los crónicos. La marca de inmunohistoquímica se observa de color rojo (flechas negras) sobre el músculo liso. Los cobayos NR crónicos mostraron una mayor marca de laminina tanto en dispersión como en intensidad. ML (músculo liso), Ep (epitelio), C (cartilago), *(**adventicia**), línea de escala igual a 200 µm. Aumento 40x.

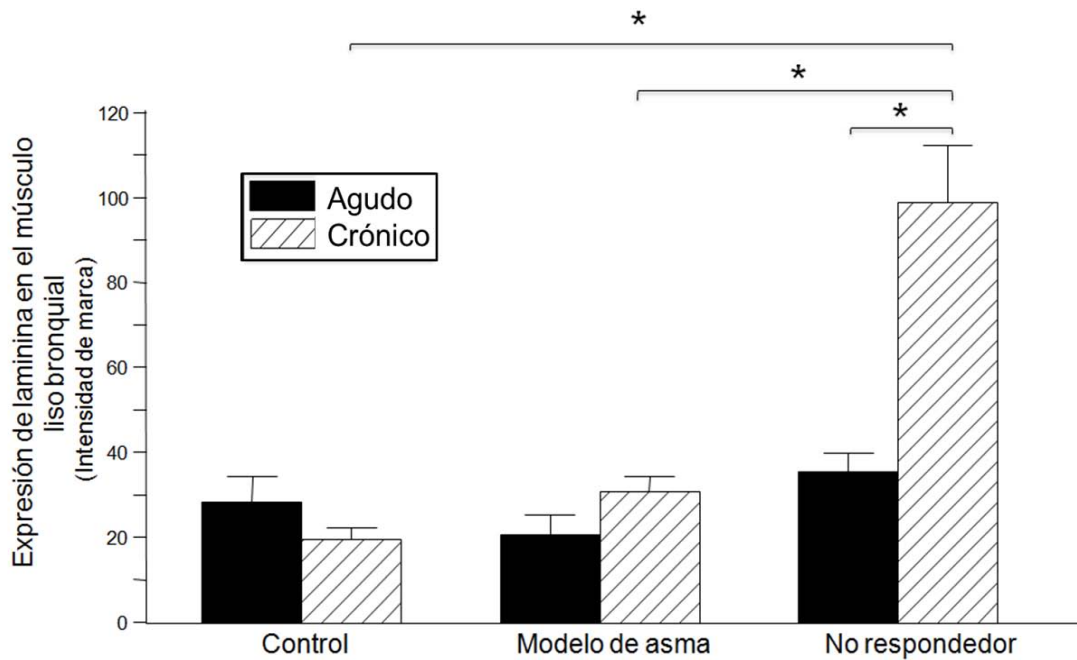


Figura 16. Intensidad de marca de laminina en el intersticio del músculo liso bronquial. En color negro se observan los cobayos agudos (3 retos, 35 días), en las barras rayadas se muestran los cobayos crónicos (12 retos, 125 días). Hubo diferencias significativas sólo en cobayos NR del modelo crónico. * $p < 0.001$. ANOVA (Bonferroni).

Intensidad de marca de laminina en el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar

La marca de laminina también se observó sobre el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar (Fig. 17).

La expresión de laminina fue muy similar a la que se encontró en el músculo liso bronquial, expresándose visualmente de forma mínima y similar en todos los grupos de cobayos a excepción de los cobayos NR crónicos, donde la expresión de laminina es mayor en el músculo liso arterial intrapulmonar (Fig. 18).

Al hacer una comparación visual entre los grupos de agudos y crónicos el número de retos no presentó un efecto en la expresión de laminina, ya sea en cobayos control o en el modelo de asma, por otro lado, al comparar los cobayos NR agudos

con los NR crónicos se observó que la laminina está incrementada en los NR crónicos.

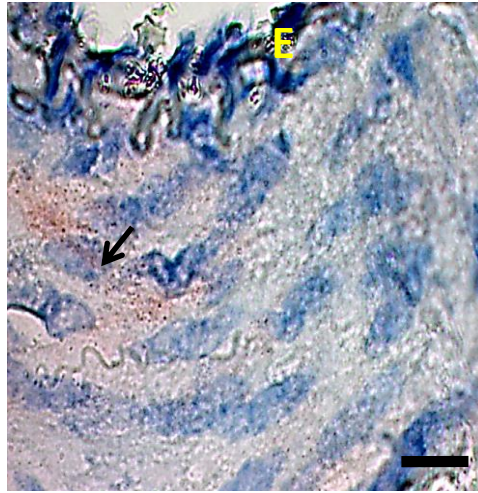


Figura 17. Detalle del músculo liso arterial intrapulmonar. En el músculo liso se puede observar como la marca de laminina se expresa en el intersticio de las células musculares (flecha negra). En (endotelio), línea de escala igual a 200 μm . Aumento 100x.

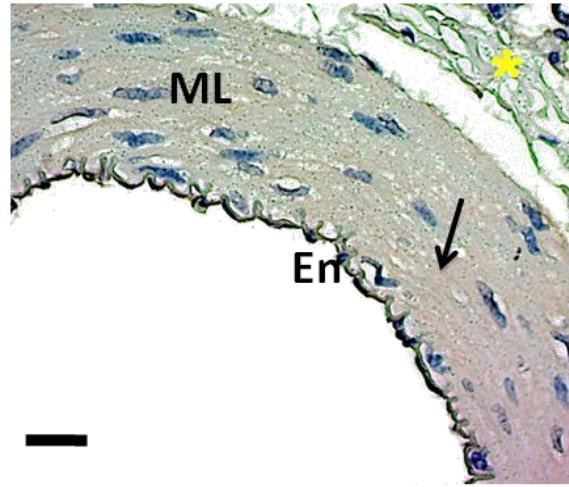
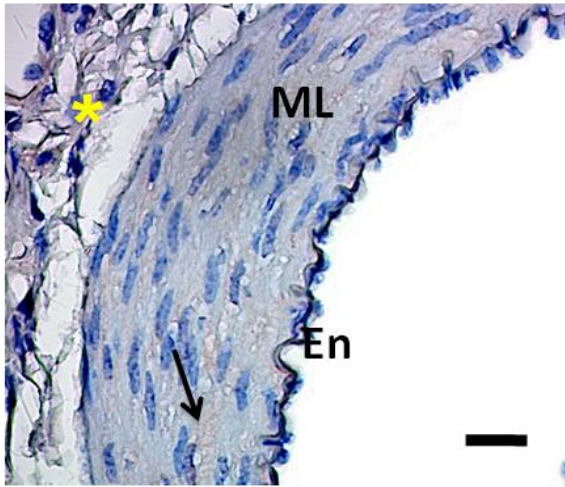
El análisis estadístico de la intensidad de marca de laminina mostró que la expresión de laminina en los cobayos de los grupos agudos permaneció de manera constante sin presentar diferencias significativas entre ellos, lo mismo ocurrió en los cobayos crónicos control y modelo de asma (Fig. 19).

El grupo de los cobayos NR crónicos fue el único en presentar un aumento significativo ($p < 0.001$) en la expresión de laminina sobre el músculo liso arterial intrapulmonar (Fig. 19).

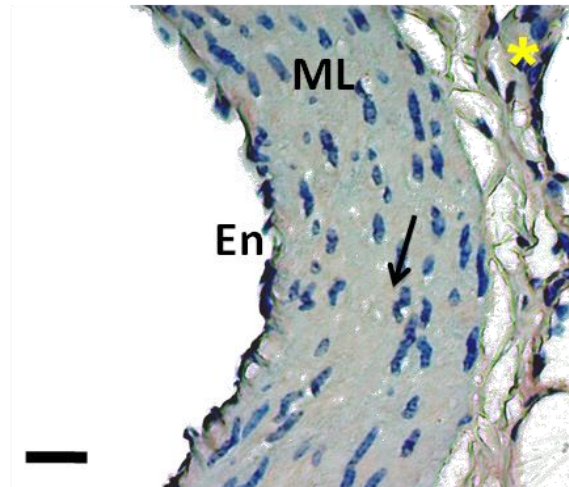
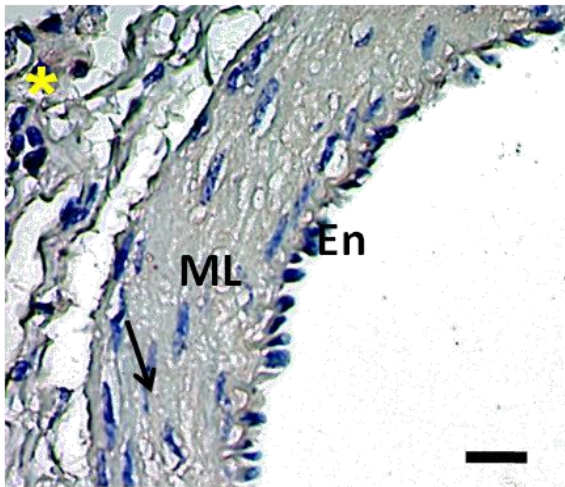
Grupo agudo (3 retos)

Grupo crónico (12 retos)

Control



Modelo de asma



No respondedor

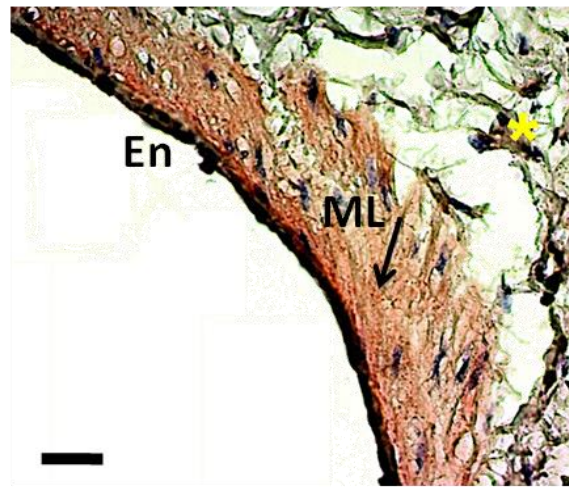
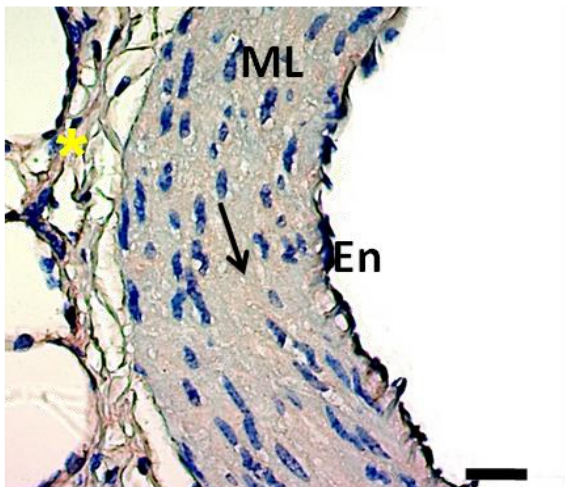


Figura 18. Marca de laminina en el intersticio del músculo liso arterial intrapulmonar. Del lado izquierdo se muestran los cobayos agudos, en el lado derecho se muestran los cobayos crónicos. La marca de laminina es de color rojo (flechas negras) y se expresa sobre el músculo liso. La laminina se vio aumentada en el músculo liso vascular pulmonar de los cobayos NR crónicos (esquina inferior derecha). ML (músculo liso), En (endotelio), * (adventicia). Línea de escala igual a 200 µm. Aumento 40x.

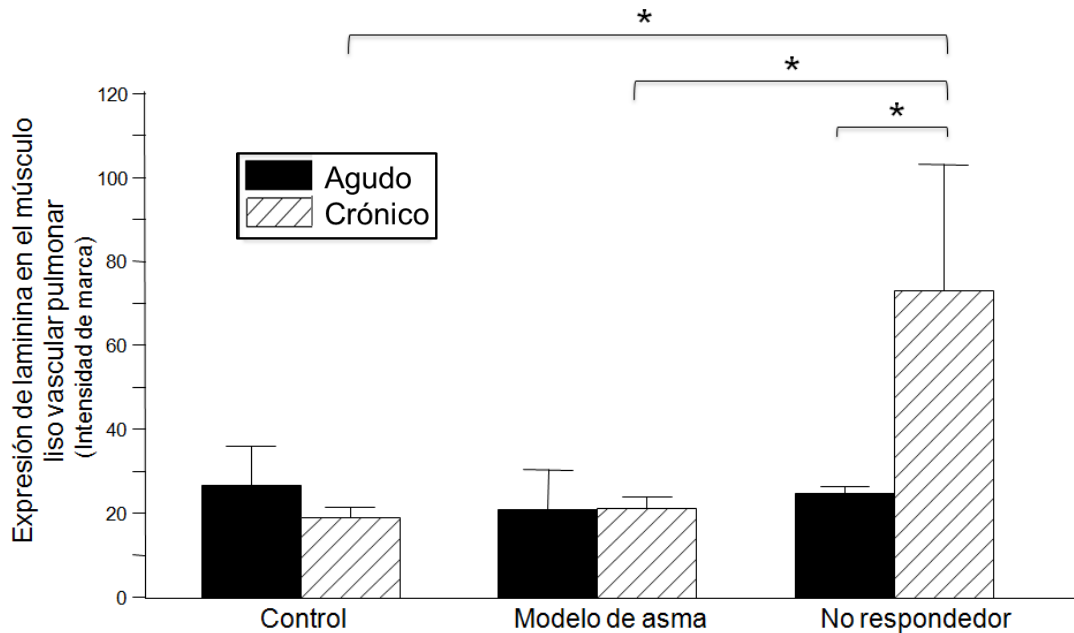


Figura 19. Intensidad de la marca de laminina en el intersticio del músculo liso vascular pulmonar. Las barras de color negro representan a los cobayos agudos (3 retos, 35 días), las barras rayadas a los cobayos crónicos (12 retos, 125 días). Con la prueba de ANOVA (Bonferroni) se determinó que la expresión de laminina aumenta significativamente sólo en los cobayos NR crónicos, respecto al modelo de asma y el control (crónicos) * $p < 0.001$.

Intensidad de marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en músculo liso bronquial

La subunidad de integrina $\alpha 6$ es un receptor celular para laminina, es por ello que también se estudió su expresión en músculo liso bronquial y vascular pulmonar.

Las microfotografías muestran los resultados de la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial (Fig. 20), donde se observa que la subunidad de integrina $\alpha 6$ se expresa en todos los grupos, aumentando en los grupos crónicos respecto a los agudos.

Particularmente los cobayos NR agudos y crónicos tienen una marca más intensa en comparación con los otros grupos agudos y crónicos respectivamente.

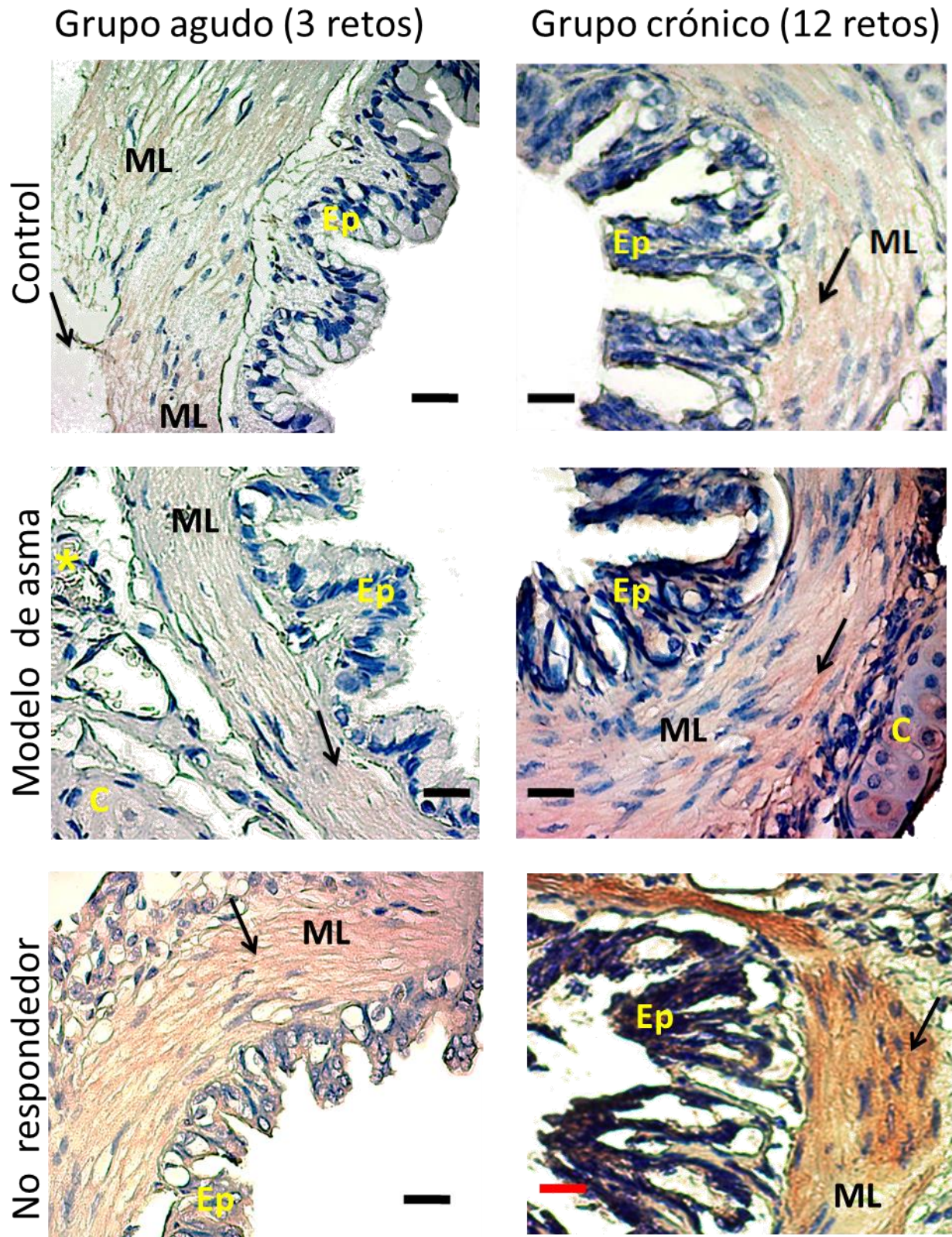


Figura 20. Marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial. A la izquierda se encuentran los cobayos agudos, a la derecha los cobayos crónicos. La marca de integrina $\alpha 6$ se observa de color rojo (flecha negra) sobre el músculo liso. La integrina $\alpha 6$ se incrementó en el modelo de asma crónico y en ambos NR, especialmente en el crónico. ML (músculo liso), Ep (epitelio), C (cartílago), * (adventicia), línea de escala igual a 200 μ m. Aumento 40x.

En la figura 21 se muestran los resultados del análisis estadístico de la intensidad de marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ sobre el músculo liso bronquial. La marca se ve aumentada en todos los grupos crónicos en comparación a los grupos agudos (incluyendo a los controles). Por otra parte, en los grupos agudos aumenta en el NR, mientras que en los grupos crónicos aumenta en el modelo de asma y en el cobayo NR ($p < 0.001$).

La marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ se incrementa, al parecer, por múltiples factores, entre ellos, la edad del cobayo (ya que los cobayos agudos tuvieron un menor número de retos que los cobayos crónicos), por ser un modelo de asma (crónicos) o por ser NR (Fig. 21).

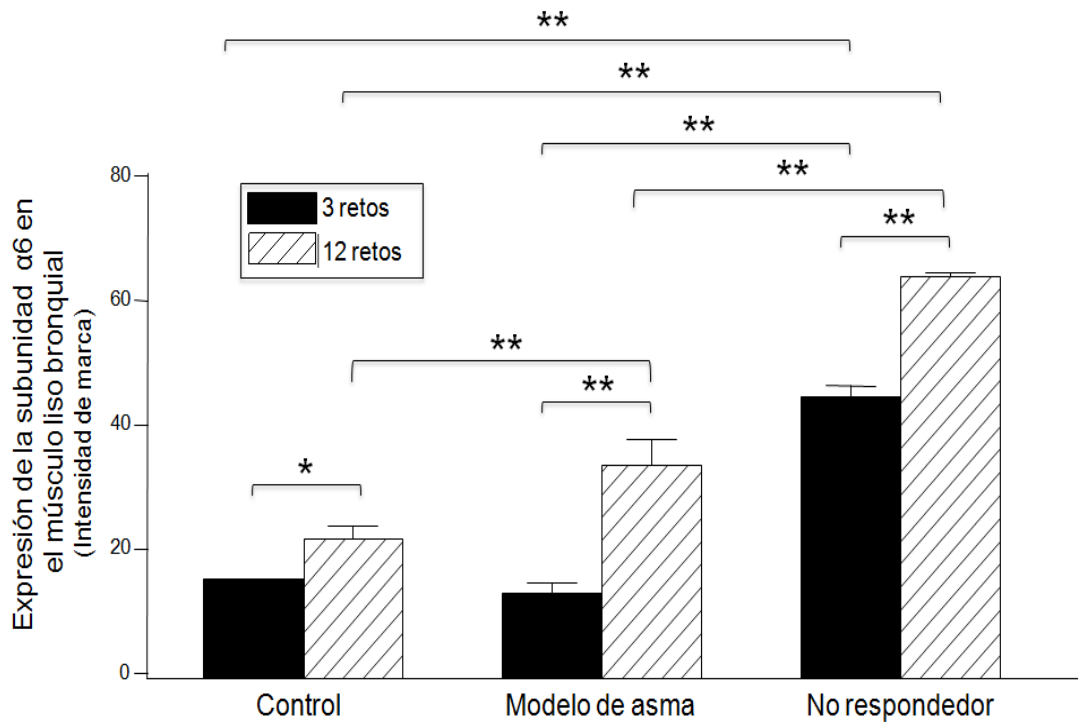


Figura 21. Intensidad de la marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial. En barras negras se muestran los cobayos agudos (3 retos, 35 días), en barras rayadas se muestran los cobayos crónicos (12 retos, 125 días). El análisis de ANOVA (Bonferroni) muestra que hay diferencias significativas en modelos agudos y crónicos, así como en el modelo de asma y los NR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Intensidad de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en músculo liso arterial intrapulmonar

La marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ se observa en todos los grupos, en especial en los grupos crónicos (Fig. 22), donde la subunidad de integrina $\alpha 6$ está más intensa.

Los cobayos NR agudos muestran un aumento de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar en comparación con el control y modelo de asma agudos, ocurre lo mismo con los cobayos NR crónicos en relación con el control y modelo de asma crónicos (Fig. 22).

Al igual que lo ocurrido con la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial, el análisis estadístico (Fig. 23) muestra que la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar se incrementa por múltiples factores, como el hecho de que los grupos sean agudos, crónicos o NR.

Grupo agudo (3 retos)

Grupo crónico (12 retos)

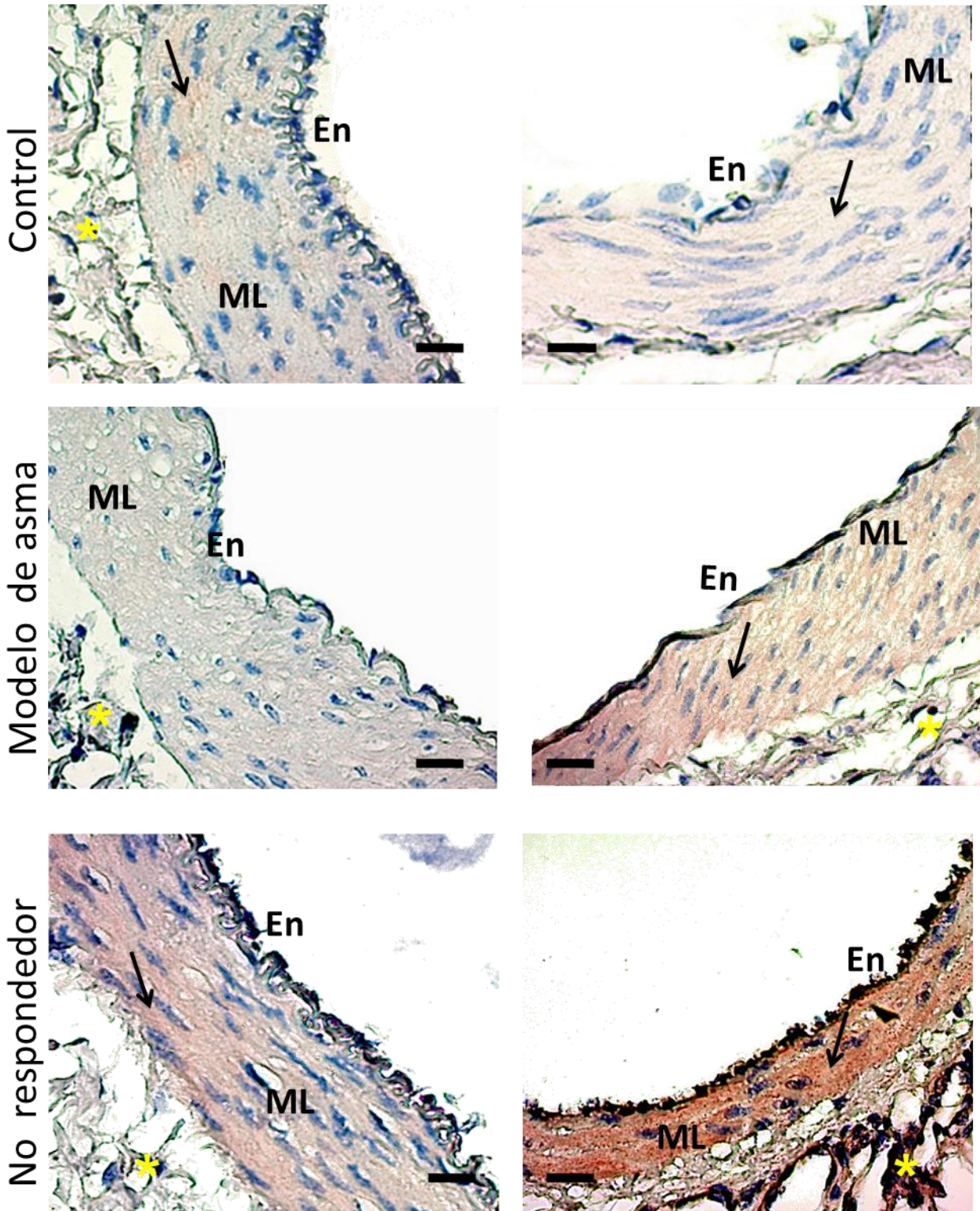


Figura 22. Marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar. Del lado izquierdo se observan los cobayos agudos, del lado derecho los cobayos crónicos. La marca de integrina $\alpha 6$ se observa de color rojo (flechas negras) sobre el músculo liso. La marca esta incrementada en el modelo de asma crónicos y en ambos NR, especialmente en el crónico. ML (músculo liso), En (endotelio), * (tejido conjuntivo). Línea de escala igual a 200 μ m. Aumento 40x

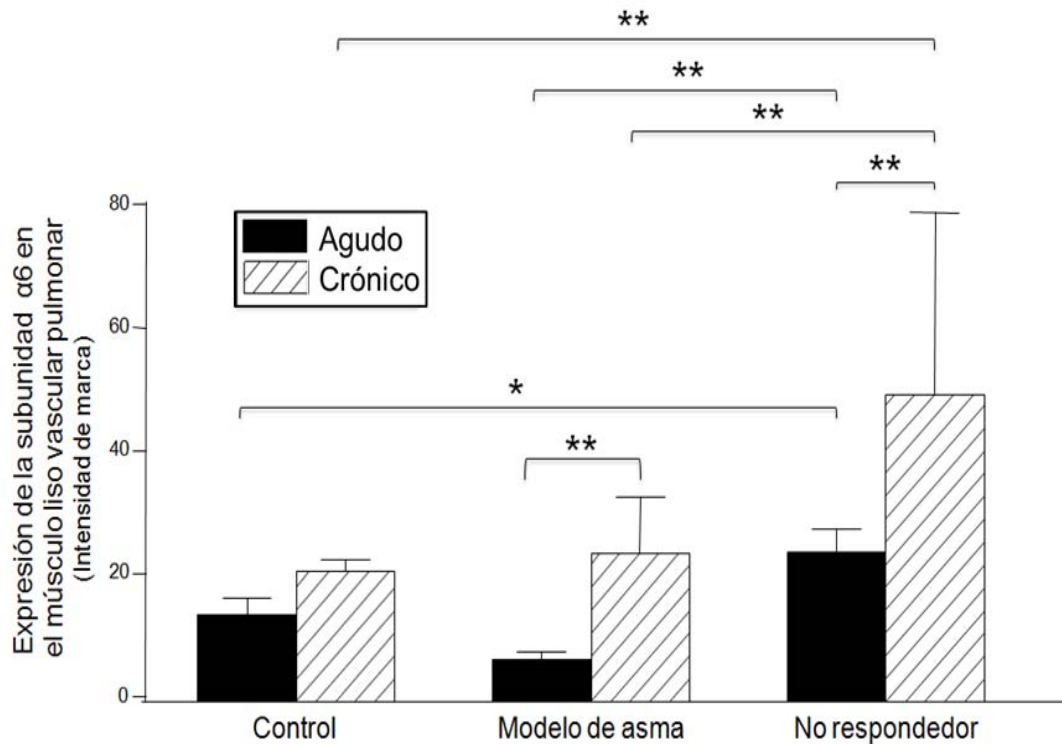


Figura 23. Intensidad de marca de la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar. Con la prueba de ANOVA (Bonferroni), se puede observar que un mayor número de retos en el caso del modelo de asma y NR aumenta la expresión de integrina $\alpha 6$. Ambos NR presentaron mayor expresión de integrina $\alpha 6$ en comparación con los controles y los modelos de asma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Correlación de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial

En la siguiente gráfica se muestra la correlación entre las expresiones de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial (Fig. 24). Cuando aumenta la expresión de laminina lo hace también la subunidad de integrina $\alpha 6$ ($r = 0.725$, $p < 0.0001$, $n = 24$) indicando una relación entre la expresión de las dos proteínas.

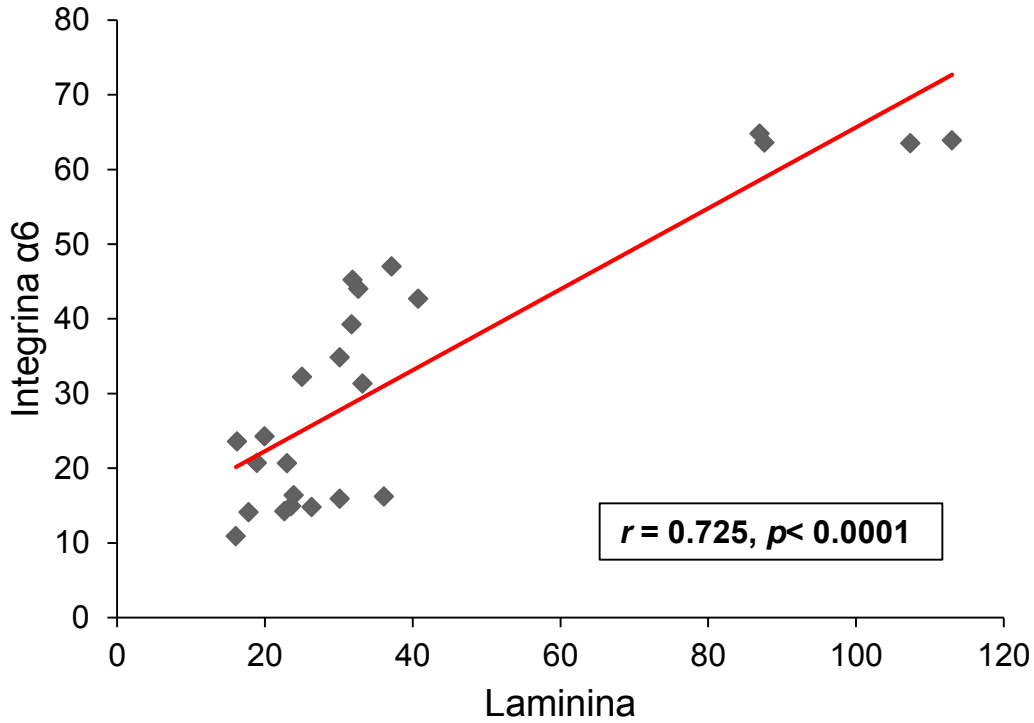


Figura 24. Correlación de la expresión de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso bronquial. r = coeficiente de correlación de Spearman.

Correlación de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar

La siguiente gráfica (Fig. 25) muestra la correlación entre la expresión de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar. El valor de $r=0.552$ ($p<0.0001$, $n=24$) indica que existe una relación positiva entre la laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$, es decir, se comportan de una forma similar aumentando una cuando la otra aumenta, ya sea en controles, modelo de asma o no respondedores.

La relación en la expresión de la laminina y su receptor la subunidad de integrina $\alpha 6$ es similar tanto en el músculo liso bronquial como en el músculo liso arterial intrapulmonar.

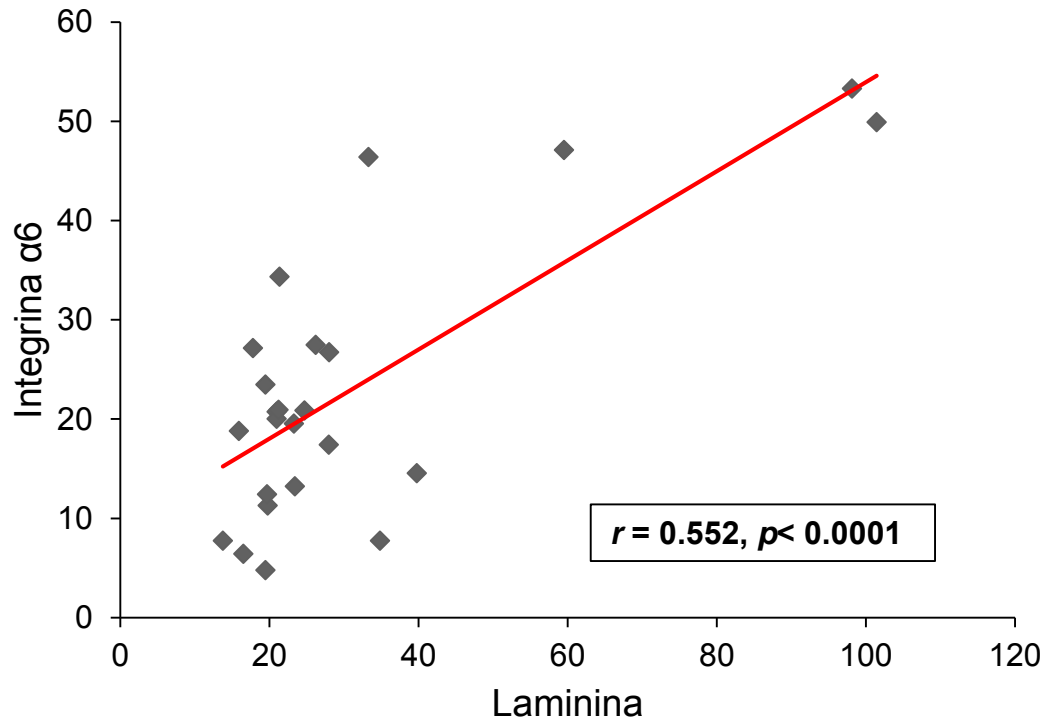


Figura 25. Correlación en la expresión de laminina y la subunidad de integrina $\alpha 6$ en el músculo liso arterial intrapulmonar. r = coeficiente de correlación de Spearman.

7. DISCUSIÓN

El músculo liso es el tejido más importante en el desarrollo de la contracción; no obstante, se sabe que el músculo liso es multifuncional^{27,74} se le ha involucrado en otros procesos como proliferación, crecimiento y síntesis de una gran cantidad de moléculas durante el daño. Durante el asma el músculo liso bronquial presenta hipercontractilidad e hiperplasia mientras que el músculo liso vascular pulmonar es hiperproliferante^{98,99,110}. Nuestros resultados mostraron que en todos los grupos la laminina se expresó de manera similar en ambos músculos lisos, bronquial y arterial intrapulmonar, a excepción del grupo NR crónico donde la laminina tuvo una alta expresión.

La laminina es una proteína de matriz extracelular que regula la proliferación y supervivencia del músculo liso, además de promover un fenotipo hipercontráctil^{72,98,99,100}, por este hecho se esperaba que la laminina se incrementara en aquellos cobayos que presentan hiperreactividad del músculo liso bronquial (cobayos modelo de asma y NR agudos) y en el músculo liso arterial intrapulmonar de cobayos sin angiogenesis (cobayos control) donde se ha observado que la laminina inhibe la proliferación de miocitos⁹⁸, contrario a esto, los resultados mostraron una alta expresión de laminina en el músculo liso bronquial de los cobayos NR crónicos donde no hay hiperractividad y en el músculo liso arterial intrapulmonar donde no hay hiperplasia. Por lo cual sugerimos que la laminina probablemente no tiene un efecto en el mantenimiento de un fenotipo hipercontráctil del músculo liso bronquial en cobayos modelo de asma, al no incrementarse en los cobayos con hiperreactividad, pero sí en los NR crónicos que no presentan ésta característica. Debido que no está expresada de igual forma en el musculo liso arterial intrapulmonar de cobayos modelo de asma y control sugiere que no se relaciona con la angiogenesis en el asma.

Con nuestros resultados hipotetizamos que la alta expresión de laminina en el músculo liso bronquial y arterial intrapulmonar en los cobayos NR crónicos pudiera tener un papel en la contención de la respuesta alérgica común. Por ejemplo, los resultados sugieren que el incremento de la laminina en el músculo liso arterial

intrapulmonar y bronquial de cobayos NR crónicos podría tener un efecto en regular el crecimiento del músculo ante el reto antigénico.

Por otra parte, un estudio reciente describe que los cobayos modelo de asma presentan un perfil inmunológico rico en linfocitos Th2, cuyas citocinas producen una respuesta inflamatoria alérgica con producción de IgE, y eosinófilos, por otro lado, los cobayos NR crónicos no presentan esas células, sino que presentan linfocitos Th1, que producen una respuesta inflamatoria a parásitos intracelulares, Tregs, que regulan las respuestas inflamatorias, y neutrófilos^{110,119}.

La alta expresión de laminina, observada en nuestros experimentos, en el músculo liso bronquial y arterial intrapulmonar de los cobayos NR crónicos podría influir en mantener el perfil inmunológico de linfocitos Th1 y neutrófilos al facilitar su adhesión y migración ya que se ha reportado que los neutrófilos y linfocitos Th1 expresan mayor cantidad de integrina $\alpha6\beta1$, un receptor para laminina, en comparación a los linfocitos Th2^{120,121,122}. Además, Colantonio y colaboradores¹²¹ estudiaron los receptores integrina $\alpha6\beta1$ en linfocitos Th1 y Th2, y cómo, la laminina influye sobre estas células en cuanto a su migración, sus resultados destacaron que la interacción de integrina $\alpha6\beta1$ con la laminina promueve la migración preferencial de linfocitos Th1.

Al medir la expresión de uno de los receptores celulares para laminina, la subunidad de integrina $\alpha6$, se observó que a comparación de la laminina, la subunidad de integrina $\alpha6$ se incrementó de forma significativa en un mayor número de grupos. En este sentido, la subunidad de integrina $\alpha6$ aumenta en relación con el número de retos, así como en los cobayos del modelo de asma y también en los NR. Por lo tanto, el incremento de la subunidad de integrina $\alpha6$ podría deberse a múltiples factores. Así mismo, encontramos que la expresión de la subunidad de integrina $\alpha6$ está correlacionada con la de laminina en el músculo liso bronquial y vascular pulmonar.

Los cobayos NR agudos tienen hiperreactividad, pero no bronco-obstrucción por el alérgeno, una condición muy similar a lo que sucede en humanos. La

hiperreactividad asintomática (sin bronco-obstrucción por alérgeno) puede preceder el asma, es decir los pacientes que tienen hiperreactividad asintomática llegan a desarrollar asma después de un tiempo determinado (3 años aproximadamente)¹¹¹, aunque es una condición poco estudiada, puede ser muy similar a lo que ocurre con los cobayos NR tanto agudos como crónicos. La alta expresión de laminina en los cobayos NR crónicos puede ser un marcador que ayude a la detección de este padecimiento y prestar mayor atención a los pacientes que puedan desarrollar asma en un futuro, para ello son necesarios otros estudios que determinen si la laminina también aumenta en LBA o en el plasma sanguíneo, y si esto es posible aplicarlo en humanos.

8. CONCLUSIÓN

Los cobayos NR son diferentes a los cobayos modelo de asma y controles, no solo en la respuesta bronco-obstructiva, sino se ha reportado que también en el perfil de células inmunológicas. Los resultados obtenidos en éste trabajo mostraron que los cobayos NR crónicos además tienen un aumento en la expresión de laminina en el músculo liso bronquial y en el músculo liso arterial intrapulmonar que no está asociada a la hipercontractilidad de la vía aérea. Por otra parte, es posible que la laminina participe en la contención de la proliferación de músculo liso arterial intrapulmonar así como de la respuesta bronco obstructiva crónica alérgica, a la vez que puede facilitar el fenotipo de linfocitos Th1, los cuales tienen un mayor número de receptores para laminina (integrina $\alpha6\beta1$).

Referencias

1. Gaga M, Vigrola A, Chanez P. Upper and lower airways: similarities and differences. *Eur Respir J*. 2001; 1 (18): 1-16.
2. Ross M, Wojciech P. Respiratory system. En: Ross M, Wojciech P. *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 6th edition. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2011. 664-697.
3. James A, Carroll N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *J Pulm Respir Med*. 2000; 4 (6): 1-8.
4. Johnson P, Black J, Carlin S, Underwood Q. The production of extracellular matrix protein by human passively sensitized airway smooth muscle cell in culture: the effect of bedomethasone. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 2145- 2151.
5. Dekkers B, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components. Drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Am Thorac Soc*. 2009; 8 (6): 683-692.
6. Duedrapgo N, Roux E. Physiology of airway smooth muscle contraction: An overview. *J Pulm Respir Med*. 2014; 4 (6): 1-8.
7. Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. How much do we know about atopic asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol*. 2006; 3 (5): 321-332.
8. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades respiratorias crónicas (en línea), en. Consulta: 19 Febrero 2015. www.who.int/respiratory/asthma/es/
9. National heart, lung and blood institute & national asthma education and prevention program. Expert panel report 3: Guideline for the diagnosis and management of asthma: Section 2. Definition, pathophysiology and pathogenesis of asthma, and natural history of asthma. 2007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7223/>
10. Vargas M. Trends of asthma in México an 11 years analysis in a National wide Institution. *CHEST J*. 2004; 6 (125): 1993- 1999.
11. Dirección General de Epidemiología (DGE), en. Consulta: 20 Febrero 2015. www.epidemiologia.salud.gob.mx

12. Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Causas y tasas de muerte. Consulta: 20 Febrero 2015. www.oecd.org/centrodemexico/estadisticas/
13. Xian Y, Wong S, Liu M, Hirota J, Li J, Ju W, *et al.* A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 2007; 13: 862- 867.
14. Chau L, Linn G, Leong K, Lapparre S, Siyve M. Fixed airways obstruction among patients with severe asthma: findings from Singapore general hospital, severe asthma phenotype study. *BMC Pulm Med.* 2014; 14 (191): 1- 9.
15. Cohn L. Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *J Clin Invest.* 2006; 116 (2): 306- 308.
16. Doeing D, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol.* 2013; 114: 834- 43.
17. Broide D, Gleich G, Coumo A, Federman E, Schwatz L, Weswerman S. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88: 673- 648.
18. Grootendorst D, Rabe K. Mechanism of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1: 77- 87.
19. Sterk P, Fabbri M, Ovanjer P, Cekereft D, O'Byrne P, Anderson S, *et al.* Airway responsiveness standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J.* 1993; 6 (16): 53-83.
20. Hopp R, Robert G, Townley R, Biven R, Bewtra A, Nair N. The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Respir J.* 1990; 141: 2- 8.
21. Donald W, Cockcroft M. Direct challenge test airway hyperresponsiveness in asthma: It's measurement and clinical significance. *CHEST Sup.* 2010; 138 (2): 188- 248.
22. Perñita T. Hiperrespuesta bronquial en el asma: patogenia y medición. *Arch Bronconeumol.* 2004; 40 (5): 8- 13.
23. Lörvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax J.* 1998; 53 (4): 419- 424.

24. O'Byrne M, Inman M. Airway hyperresponsiveness. CHEST J. 2003; 123 (3): 1-11.
25. Becerra M. Fisiopatología del asma. Neumología y cirugía de tórax. 2009; 68: 1- 13.
26. Peralta L. Músculo. En: Rivas P, Rugeire M, Ortiz R, Parra L, Ramírez M, Velasco M, Peralta L. Impregnaciones metálicas, Atlas fotomicrográfico de estructuras subcelulares, células y tejidos animales. 1ra edición. México D.F. Las prensas de ciencias; 2010. 85- 103.
27. Vodenicharov A. Structure and function of smooth muscle with special reference to mast cells. En: Harou S. Current basic and pathological approaches to the function of muscle cells and tissues. 1st edition. Croatia: InTech; 2012. 346-361.
28. Muscle. En: Widmaier E, Hershel R, Strang K. Vander's Human Physiology: The mechanism of body function. 9th edition. London/ United States: McGraw Hill. 267-310.
29. Fisiología del Músculo. En: Gal B, López M, Velasco A, Prieto J. Bases de la Fisiología. 2da edición: Madrid España; Tébar 2007. 77-86.
30. Ouedraogo N, Roux E. Physiology of airway smooth muscle contraction: An overview. J Pulm Respir Med. 2014; 4 (6): 1- 6.
31. Brendan J, Canning B. Parasympathetic innervation of airways smooth muscle: structure, innervation and neurotransmission. En: Raeburn D, Giembycz M. Airways smooth muscle: Structure, Innervation and Neurotransmission. 1st edition. Switzerland:Birkhäuser; 1994. 43-47.
32. Chand N, Duane S. Histamine. En: Raeburn D, Giembycz. Airways smooth muscle: neurotransmitters amines. 1st edition. Switzerland: Birkhäuser; 1995. 131-150.
33. Chen C, Kudo M, Rotaganira F, Takano H, Lee C, Atakilit A. Integrin $\alpha 9\beta 1$ in airway smooth muscle suppress exaggerated airway narrowing. J Clin Invest. 2012; 122: 2916- 2927.
34. Jesudason E. Airway smooth muscle: an architect of the lung?. Thorax. 2008; 64: 541- 545.

35. Mitzner W. Airway smooth muscle, the appendix of the lung: pulmonary perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 169: 787- 790.
36. Miller W. The musculature of the finer division of the bronchial tree and it's relation to certain pathological conditions. *Am Rev Tuberculosis.* 1921; 5: 689-704.
37. Bullowa J, Gottlieb C. Additional experimental studies in bronchial function. *Laryngoscope.* 1922; 32: 284- 289.
38. Perez F. On lung nerves and neurogenic injury. *Annuary Medical.* 2002; 34: 226- 240.
39. Hober H, Koesser K. The pathology of bronchial asthma. *Arch Int Med Exp.* 1922: 30; 689- 760.
40. Fernandes D, McConville F, Stewart A, Kalinichenko V, Solway J. Can we differentiate between airway and vascular smooth muscle?. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 3(11): 805- 810.
41. Kurpinski K, Park J, Thakar R, Song L. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Tech Science Press.* 2006; 3 (1): 21- 34.
42. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Baptiste J. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take multiple roles. *Cardiovasculature Research, Eur Soc Cardiol.* 2012; 95: 194-Fixman 204.
43. Introduction to cardiovascular system. En: Klabunde P, Richard E. *Cardiovascular physiology concepts.* 2nd edition. Philadelphia, United States: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 1- 8.
44. Carroll N, Cooke C, James A. Bronchial blood vessels dimensions in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155 (2): 689-695.
45. Hong W, Kraft M, Rex M, Richard J. Evaluation of blood vessels and edema in the airways of asthma patients. *CHEST Clin Invest.* 2001; 119: 416-422.
46. Fixman E, Stewart A, Martin J. Basic mechanism of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J.* 2007; 29 (2): 379-389.

47. Robinson D, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley A, *et al.* Predominant Th2-like bronchialveolar T- lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992; 326 (5): 379-389.
48. Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Gledlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136: 2348-2357.
49. Robinson D, Hamid Q, Ying S. Evidence for a predominant Th2 type bronchoalveolar lavage T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl Med.* 1992; 326: 298-304.
50. Holgate S, Davies T, Lactaie D. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105: 193-204.
51. Pudd C, Palasa S, Richter A, Howarth P, Holgate S. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J.* 2000; 14; 1362-1374.
52. Vignola A, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Cell Immunol.* 2000; 105: 1041-1053.
53. Phipps S, Benyahai E, Ou T, Barkans J, Robinson D, Key A. Acute allergen induced airway remodeling in atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31: 626-632.
54. Akers I, Parsons M, Hill H, Hollenberg M, Sunjar S, Laurent G. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease activated receptors. *Am J Physiol Lung.* 2000; 278: 193-201.
55. Howarth P, Knox A, Amroni Y, Tiiba O, Pnottieri R, Johnson M. Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114 (2): 32-50.
56. Hamann K, Vieira J, Halayko A. Fas cross-linking induces apoptosis in human airway smooth muscle cells. *Cell Mol Biol.* 2000; 278: 618-624.
57. Oltmanns U, Sukkar M, Xie S, John M, Chung K. Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32: 334-341.
58. Bara I, Ozier A, Tunon M, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Eur Respir J.* 2010; 36: 1174-1184.

59. Ma X, Chang Z, Kong H, Wang Y, Unruh H, Stephens N, Lavidette M. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung*. 2002; 283: 1181-1189.
60. Lambert R, Wiggs B, Kuwano K, Hogg J, Pare P. Functional significance of increase airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol*. 1993; 74: 2771-2781.
61. Oliver M, Fabry B, Marinkovic A, Mijailovich S, Butler J, Fredberg J. Airway hyperresponsiveness, remodeling and smooth muscle mass: right, answer, wrong reason?. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37: 264-272.
62. Hakonarson H, Maskeri N, Carter C, Gruntein M. Regulation of Th1-Th2 type cytokine expression and action in atopic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest*. 1999; 103 (7): 1077-1087.
63. Damera G, Tliba O, Panetlieri A. Airway smooth muscle as a immunomodulatory cell. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009; 22 (5): 353-359.
64. Berger P, Girodet P, Begueret H. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J*. 2003; 17: 2139-2141.
65. Brightling C, Ammit A, Kaur D. The CxCL10/CcCR3 axis mediates human lung mast cells migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 1103-1108.
66. Fixman E, Stewart A, Martri J. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J*. 2007; 24: 379-389.
67. Gosens R, Roscinni S, Dekkers B, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D, *et al*. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. *Eur J Pharmacol*. 2008; 585: 385-397.
68. Ozier A, Allard B, Bara I, Pierre O, Trian T, Marthan R, *et al*. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathology. *J Allergy*. 2011; 2011: 3-21.
69. James A, Elliot J, Carrol M, Mauad T, Bai T, Abramson M, *et al*. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185 (10): 1058-1064.

70. Benayoun L, Druilne A, Dombret C, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167 (10): 1360-1368.
71. Nguyen T, Ward P, Hirts J. β 1 Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171 (3): 217-223.
72. Parameswaran K, Radford K, Zou J, Janssen P, O'Byrne P, Cox P. Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration. *Eur Respir J.* 2004; 24 (4): 545-551.
73. Bai T, Cooper J, Kolmer T. The effect of the age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 663-669.
74. Peter R, Johnson A, Burgess K, Qi G, Maree P, Boustany S, Stephen M. *et al.* Connective tissue growth factor induces extracellular matrix in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (1): 32-41.
75. Roberts C. Is asthma a fibrotic disease?. *CHEST.* 1995; 107: 111-117.
76. Altraja A, Laitineri A, Virtanen I. Expression of laminins in the airways in various types of asthmatic patients: a morphometric study. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15: 482-488.
77. Vignola A, Chanez P, Chiappara G. Transforming growth factor β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 591-599.
78. Dekkers B, Schaafsma D, Netemans S, Zaagsma J, Meurs H. Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 29 (2): 405-413.
79. Fernandes D, Bonacci J, Stewart A. Extracellular matrix, integrins and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Target.* 2006; 7 (5): 567-577.
80. Bai T, Knight D. Structural changes in the airway in asthma: observations and consequences. *Clin Sci Biochem Soc.* 2005; 108: 463-477.
81. Homer R, Elias J. Airway remodelling in asthma: Therapeutic implications of mechanism. *Am Physiol Soc.* 2005; 20: 28-35.

82. Ji K, Sook L, Chin R, Seung K, Soon S, Young K. Effect of aging on airway bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 2010; 36 (5): 1174-1184.
83. Paredi P, Barnes P. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. *Thorax.* 2009; 64: 444-450.
84. Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiedgand S, Holash J. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407: 247-248.
85. Knox A, Corbett L, Stocks J, Hollard E, Yang M, Zhu M, *et al.* Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation via protein kinase C and prostanoind- dependent mechanism. 2001; 15 (13): 2480-2488.
86. Ribatti O, Puxeddu I, Crivellato E, Nico B, Vacca A, Schaffer F. Angiogenesis in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39 (12): 1815-1821.
87. Wei H, Kraft M, Rex M, Richard J. Evolutions of blood vessels and edema in the airway of asthma patients. *CHEST Clin Invest.* 2001; 119: 416-422.
88. Wilson J, Kotsimbos T. Airway vascular remodeling in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003; 3(2): 153-158.
89. Rouslahti E, Engvall E. Integrins and vascular extracellular matrix assembly. *J Clin Invest.* 1997; 99 (6): 1149-1152.
90. Bosman F, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Path.* 2003; 200: 423-428.
91. McGowan K, Marinkovich M. Laminins and humans diseases. *Micro Res Tech.* 2000; 51: 262-272.
92. Haralson M, Hassell J. Extracellular matrix: a practical approach. *Biochem Edu.* 1996; 24 (3): 189-200.
93. The extracellular matrix of animals. En: Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Alberts molecular biology of the cell.* 4th edition. United States: Garland Science. 2002. 1838-2081.
94. Colognato H, Yurchenco P. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000; 218 (2): 213-234.

95. Wu J, Santaro S. Differential expression of integrin alpha subunits support distinct roles during lung bronchi morphogenesis. *Dev Dyn.* 1996; 206 (2): 169-181.
96. Cremona O, Savoia P, Marchisio P, Gabbiani G, Chaponnier C. The $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrin subunits are expressed by smooth muscle cells of human small vessels: A new localization in mesenchymal cells. *J Histochem Cytochem.* 1994; 42 (9): 1221-1228.
97. Tran T, Ens-blackie K, Rector E, Stelmack G, Mc Neill K, Tarone G, *et al.* Laminin-binding integrin $\alpha 7$ is required for contractile phenotype expression by human myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37: 668-680.
98. Hirts S, Twart C. Differential effects of extracellular matrix proteins on human smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23: 335-344.
99. Tran T, McNeill K, Gerthoffer W, Unruh H, Halayko A. Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respir Res.* 2006; 7: 117-128.
100. Tran T, Ming C, Kit J, Qiao Y, Yein C, Khuan O, *et al.* Laminin drives survival signals to promote a contractile smooth muscle phenotype and airway hyperreactivity. *FASEB J.* 2013; 27: 3991-4003.
101. Brooks P, Montgomery M, Rosenfeld M, Fersfeld R, Hu T, Lier G, *et al.* Integrin $\alpha \beta 3$ antagonist promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994; 79: 1157-1164.
102. Molsceva E. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* 2001; 52: 372-386.
103. Obata H, Hayashi K, Nishida W, Momiyama T, Uchida A, Ochi T, *et al.* Smooth muscle cell phenotype dependent transcriptional regulation of the $\alpha 1$ integrin gene. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26643-26651.
104. Hedin U, Bottger B, Forberg E, Johansson S Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin and phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cells Biol.* 1988; 107: 307-319.

105. Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran P, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 837- 846.
106. Hoquervast F, Admiraql L, Niessen C, Kuikman I, Janssen H, Daams H, *et al.* Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit. *J Cell Biol.* 1993; 121 (1): 179-191.
107. Lee E, Lotz M, Steele G, Mercurio A. The integrin $\alpha 6\beta 4$ is a laminin receptor. *J Cell Biol.* 1992; 117 (3): 671-678.
108. Ricciardolo F, Ni J, Kamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model of asthma. *Curr Drug Targets.* 2008; 9 (6): 452-465.
109. Kim J, Shim J, Lee S, Kwan Y, Cho Y, In K, *et al.* Early bronchoconstriction after allergen challenge of anesthetized guinea pig. *Tuberc Respir Dis.* 1998; 45: 99-106.
110. Ramos R, Campos M, Martinez E, Bazán B, García E. Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Exp Lung Res.* 2013; 39: 136-145.
111. Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. *Eur Respir J.* 1999; 14: 63-73.
112. Zhong N, Chen R, Yang M, Wu Z, Zheng J, Li Y. Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? A two-year follow-up of young students with bronchial hyperresponsiveness. *Chest* 1992; 102: 1104-1109.
113. Kolnaar B, Folgering H, van den Hoogen H, van Weel C. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in adolescents and young adults. *Eur Respir J* 1997; 10: 44-50.
114. Laprise C, Boulet L. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a three-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 403-409.
115. Rasmussen F, Taylor D, Flannery E, Cowan J, Greene J, Herbison GP, Sears M. Outcome in adulthood of asymptomatic airway hyperresponsiveness in childhood: a longitudinal population study. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34: 164-171.

116. Boulet L, Prince P, Turcotte H, Lemiere C, Olivenstein R, Laprise C, Larivee P, Begin P, Laviolette M. Clinical features and airway inflammation in mild asthma versus asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Respir Med* 2006; 100: 292-299.
117. Van den Nieuwenhof L, Schermer T, Heijdra Y, Bottema B, Akkermans R, Folgering H, van Weel C. Are asymptomatic airway hyperresponsiveness and allergy risk factors for asthma? A longitudinal study. *Eur Respir J* 2008; 32: 70-76.
118. Jeyapradha D, Rajeshwa G, Kaliyappan K, Palanisamy M. Application of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied*. 2012; 4 (2): 307-309.
119. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they?. *BMJ*. 2000; 321 (7258): 424.
120. The National Center for Biotechnology Information (NCBI). Itga 6 integrin alpha 6. Consulta: 20 Abril 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16403>
121. Colantonio L, Lellem A, Clissi B, Pardi R, Rogge L, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Upregulation of integrin $\alpha 6/\beta 1$ and receptor CCR1 by interleukin-12 promotes the migration of human type 1 helper T cells. *Am Soc Hematol*. 1999; 94 (4): 2981-2989.
122. Sinigaglia F. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. En: Theofilopoulos A, Bona C. *The molecular pathology of autoimmune diseases*. 2nd edition. New York USA: Taylor & Francis; 2002. 142-151.