



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**RELACIÓN DE LA REMODELACIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS A NIVEL  
ESTRUCTURAL Y MOLECULAR CON EL DESARROLLO DE LA  
HIPERREACTIVIDAD EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ÁLVAREZ SANTOS MAYRA DINORAH**

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

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA NAVARRO GONZÁLEZ**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ LÓPEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 31 de octubre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ÁLVAREZ SANTOS MAYRA DINORAH** con número de cuenta 301005117, con la tesis titulada "RELACIÓN DE LA REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA A NIVEL ESTRUCTURAL Y MOLECULAR CON EL DESARROLLO DE LA HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA", realizada bajo la dirección de la **DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS**:

Presidente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
Vocal: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ  
Secretario: DR. VICTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ  
Suplente: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Suplente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de marzo de 2017

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

---

1. Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
2. Al apoyo recibido por CONACYT con número de registro 294207.
3. A la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins, a la Dra. Rosa Navarro González y al Dr. Víctor Manuel Ruíz López por ser miembros del Comité Tutor.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

---

*ESTE ESTUDIO SE LLEVÓ A CABO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS Y FUE FINANCIADO POR EL FONDO DE CIENCIA BÁSICA 256197.*

*ME AGRADEZCO POR DARME LA OPORTUNIDAD DE CONOCERME, ARRIESGARME, ENFRENTAR MIS PEORES MIEDOS, POR TOMAR DECISIONES IMPORTANTES, POR QUERER Y TENER LAS GANAS DE SIEMPRE SALIR ADELANTE HASTA EN LAS PEORES CIRCUNSTANCIAS Y POR PERMITIRME LUCHAR POR LO QUE MÁS QUIERO, SER FELIZ.*

*A MI MADRE, POR SIEMPRE ESTAR EN TODO MOMENTO, POR SER MI COMPAÑERA DE VIDA Y POR SIEMPRE ESTAR PRESENTE EN CUALQUIER CIRCUNSTANCIA. TE AMO.*

*A ROSA MARÍA SANTOS, ADRIÁN, RAFAEL, CRISTIAN, GALADRIEL, ROSA MARÍA RODRÍGUEZ Y GERARDO POR SER PARTE DE LA GRANDIOSA FAMILIA QUE HEMOS FORMADO. SÉ QUE CUENTO CON ELLOS Y ME LLENAN DE ORGULLO.*

*A MIS QUERIDAS AMIGAS LOOPY, ROXANA Y TLAMA QUE HAN ESTADO A MI LADO DURANTE MUCHOS AÑOS COMPARTIENDO TODO TIPO DE HISTORIAS. GRACIAS POR IR CONMIGO EN ESTE CAMINO CON MUCHOS TROPIEZOS, PERO TAMBIÉN CON GRANDES ÉXITOS. SON Y SEGUIRÁN SIENDO PARTE DE MI HISTORIA.*

*A LA DRA. BLANCA BAZÁN LE AGRADEZCO DE UNA FORMA MUY ESPECIAL, GRACIAS A ELLA ME HE FORMADO PROFESIONALMENTE. ES UN GRAN EJEMPLO A SEGUIR. LE ADMIRO POR TODO LO QUE HA PODIDO LOGRAR GRACIAS A LA LUCHA CONSTANTE POR PERSEGUIR SUS OBJETIVOS. ES Y SERÁ MI EJEMPLO. GRACIAS POR TODA LA PACIENCIA.*

*A MARYANA Y SANDY QUE ME HAN ENSEÑADO TANTO EN EL CAMINO PROFESIONAL. MIS MAS GRANDES ALUMNAS. LAS ADMIRO POR TODO LO QUE HAN LOGRADO Y POR FORMAR PARTE DE MI CAMINO EN LA CIENCIA.*

*DE FORMA GENERAL, GRACIAS A TODAS LAS PERSONAS QUE CONOCÍ EN ESTE CAMINO, POR SUS ENSEÑANZAS, POR LOS MOMENTOS QUE SONREÍMOS, POR LOS MOMENTOS QUE NOS ENOJAMOS PORQUE NOS SIRVIÓ DE APRENDIZAJE Y SOBRE TODO, GRACIAS POR HACERME FELIZ A SU LADO.*

*La mayor aventura es la que nos espera.*

*Hoy y mañana aún no se han dicho.*

*Las posibilidades, los cambios son todos vuestros por hacer.*

*El molde de su vida en sus manos está para romper.*

*-El Hobbit de J.R.R. Tolkien.*

## ÍNDICE

---

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
VÍAS AÉREAS .....	5
ASMA .....	6
EPIDEMIOLOGÍA DEL ASMA .....	8
FENOTIPOS DEL ASMA.....	9
ASMA ALÉRGICA .....	10
REMODELACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS VÍAS AÉREAS .....	11
OBSTRUCCIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS .....	12
HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS .....	13
MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS .....	14
CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS .....	14
MECANISMOS DE SENSIBILIZACIÓN DE LA MAQUINARIA CONTRÁCTIL DEL MÚSCULO LISO .....	17
CAVEOLAS .....	18
ADHESIONES FOCALES.....	20
INTEGRINAS .....	22
ILK.....	24
MLCP .....	25
MYPT1 .....	25
FOSFORILACIÓN DE LA MYPT1.....	27
JUSTIFICACIÓN .....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
METODOLOGÍA.....	31
ANIMALES .....	32
SENSIBILIZACIÓN ANTIGÉNICA .....	32
PLETISMOGRAFÍA BAROMÉTRICA .....	33
REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS.....	35

EUTANASIA DE LOS COBAYOS Y EXTRACCIÓN DE TRÁQUEA .....	35
HISTOLOGÍA CONVENCIONAL Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO AUTOMATIZADO .....	36
INMUNOFLUORESCENCIA.....	36
CITOMETRÍA DE FLUJO .....	37
PROTEÍNAS .....	38
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	39
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA .....	39
ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS .....	40
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	40
EXTRACCIÓN DE RNA .....	41
PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	41
RACE-PCR.....	42
MATERIALES .....	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
RESULTADOS .....	44
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIÓN .....	63
PERSPECTIVAS .....	64
LITERATURA CITADA.....	65
ANEXO I: ARTÍCULO REQUISITO I .....	75
ANEXO II: ARTÍCULO REQUISITO II .....	88



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

---

- Figura 1. Estructura de las vías aéreas en humano
- Figura 2. Estructura de la pared de las vías aéreas
- Figura 3. Mecanismos inmunológicos en el asma alérgica
- Figura 4. Cambios estructurales en la pared de las vías aéreas
- Figura 5. Vías de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  para el desarrollo de la contracción del músculo liso de las vías aéreas
- Figura 6. Mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$
- Figura 7. Representación espacial de la caveola y el retículo sarcoplásmico
- Figura 8. Representación esquemática de la estructura de la MLCP
- Figura 9. Modelo de sensibilización y administración de retos antigénicos en cobayos
- Figura 10. Equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento
- Figura 11. Obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados
- Figura 12. Remodelación de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma
- Figura 13. Expresión de Caspasa 3 en músculo liso de cobayos del modelo de asma
- Figura 14. Expresión de Caveolina-1 en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma
- Figura 15. Determinación de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en la pared de las vías aéreas
- Figura 16. Expresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en miocitos y tejido conectivo de las vías aéreas
- Figura 17. Expresión de *ITGB1* en miocitos traqueales de cobayo
- Figura 18. Expresión de ILK en miocitos traqueales en un modelo de asma
- Figura 19. Expresión de Paxilina, Talina y Actina en miocitos traqueales en un modelo de asma
- Figura 20. Expresión de MYPT1 Thr<sup>696</sup> en un modelo de asma
- Figura 21. Modelo de remodelación molecular de las adhesiones focales y el desarrollo de la contracción muscular
- Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la RT-PCR cuantitativa
- Tabla 2. Intensidad relativa de fragmentos polipeptídicos de la subunidad  $\beta 1$  de integrina

## ABREVIATURAS

---

GINA	Global Initiative for Asthma
OMS	Organización Mundial de la Salud
IgE	Inmunoglobulina E
FcεRI	Receptor de alta afinidad de IgE
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
MEC	Matriz extracelular
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentraciones intracelulares del ion calcio
VOCC	Canales de calcio operados por voltaje
GPCR	Receptores de calcio acoplados a proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
PLC-β	Fosfolipasa C, isotipo β
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
DAG	Diacilglicerol
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
RyR	Receptor de rianodina
SOCC	Canales de calcio operados por almacén
STIM1	Molécula de interacción estromal 1
Orai1	Proteína canal de calcio activada por la liberación de calcio
ATP	Adenosina trifosfato
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
Cav-1	Caveolina-1
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
NCX	Intercambiador sodio/calcio
TRPC1	Receptor canal transitorio 1
ILK	Cinasa ligada a integrina
PP1cδ	Subunidad catalítica de fosfatasa tipo 1, isoforma δ
MYPT1	Subunidad 1 de la fosfatasa de miosina
ROK	Cinasa de Rho
MYPT1K	Cinasa de MYPT1
CPI17	Inhibidor de la fosfatasa 1 potenciada por cinasa C
PKC	Proteína cinasa C
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
RACE-PCR	Rápida amplificación de DNA complementario terminal
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RhoA	Proteína A GTPasa pequeña de la familia de Rho
RhoGEF	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina

## RESÚMEN

---

En términos generales, la remodelación es un concepto que se usa para describir modificaciones, alteraciones o transformaciones que suceden al nivel de la estructura de un órgano o tejido incluyendo sus componentes moleculares. En el asma, se ha descrito al proceso de remodelación como cambios estructurales y moleculares de las vías aéreas. En particular, se ha enfatizado en el estudio de la remodelación molecular de las adhesiones focales del músculo liso debido a que este tejido es el principal protagonista de la fisiopatología del asma. Esta remodelación incluye una reorganización espacio-temporal de las moléculas de adhesión y receptores, como las Integrinas, y adaptadores, como la caveolina, talina y paxilina. No obstante, se ha reconocido que el papel de la remodelación tanto estructural como molecular en la fisiopatología del asma es poco claro. En el presente estudio se evaluó el efecto de la remodelación del músculo liso en un modelo de asma alérgica en el cobayo. Para esto, se utilizaron cobayos sensibilizados y retados con antígeno (ovoalbúmina). El grupo de cobayos control recibió solución salina en vez del antígeno. Los retos antigénicos administrados cada diez días indujeron broncoobstrucción e hiperreactividad, proliferación de células caliciformes en epitelio bronquial e hiperplasia de músculo liso vascular en el tercer reto antigénico. En el músculo liso vascular la hiperplasia se acompañó de la disminución en la expresión de caspasa-3. Paradójicamente, el músculo liso de las vías aéreas no mostró hiperplasia ni hipertrofia, ni se observó la fibrosis de la vía aérea característica de la remodelación de este tejido. A nivel molecular, el análisis de citometría de flujo en miocitos traqueales del modelo de asma, mostró un mayor número de células positivas a caveolina-1 comparado con el grupo control. Este incremento en la expresión de caveolina-1 también fue demostrado por western blot. La obstrucción de las vías aéreas y la hiperreactividad correlacionó con el incremento en la expresión de caveolina-1 en los miocitos ( $P < 0.05$ ;  $r = 0.69$  y  $-0.52$ , respectivamente). Una proteína asociada a caveolina-1, la subunidad  $\beta 1$  de integrina, se observó, mediante estudios de inmunohistoquímica

y microscopía electrónica, compartiendo la misma distribución en estructuras en las vías aéreas incluyendo zonas de la lámina propia. Un análisis posterior, también por microscopía electrónica, mostró que la subunidad  $\beta 1$  de integrina contenía tanto los dominios citosólicos y extracelulares distribuidos en la lámina propia. Mediante la técnica de western blot, se detectaron varios polipéptidos con pesos moleculares similares que fueron identificados por anticuerpos específicos contra los dominios citosólico y extracelular en miocitos de las vías aéreas y en el tejido conectivo que rodea la banda del músculo liso sin mostrar cambios en el peso molecular entre los grupos control y modelo de asma. En el músculo liso traqueal, estudios en citometría de flujo y western blot mostraron que la expresión de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina también fue similar en ambos grupos. No obstante, se observó un incremento en el mRNA de *ITGB1* (gen de la subunidad  $\beta 1$  de integrina) en miocitos traqueales en el grupo de cobayos del modelo de asma, aunque el análisis de RACE-PCR de *ITGB1* en miocitos traqueales no mostró variantes por empalme alternativo. Los niveles de expresión de proteínas asociadas a la subunidad  $\beta 1$  de integrina como la cinasa ligada a integrina (ILK) y la paxilina disminuyeron en los cobayos del modelo de asma, pero no los de talina ni  $\alpha$ -actina. Asimismo, los niveles de una proteína asociada a ILK, la subunidad 1 de la fosfatasa de la miosina (MYPT1) fosforilada en la Thr<sup>696</sup>, se incrementaron en los cobayos del modelo de asma. Conclusión, aunque se observó remodelación epitelial en la vía aérea y estructural en el músculo liso vascular, no se observaron cambios en la estructura del músculo liso de la vía aérea. No obstante, a nivel molecular, el músculo liso de las vías aéreas mostró cambios en la expresión de caveolina-1, ILK, paxilina y MYPT1. Por otro lado, la subunidad  $\beta 1$  de integrina es secretada en la pared de las vías aéreas de cobayos, aunque la secreción no cambia en el modelo de asma en comparación con los controles. Sin embargo, parece estar asociada a una alteración en el ensamblaje de proteínas en las adhesiones focales como ILK y paxilina sugiriendo un proceso de remodelación molecular de estas adhesiones focales.

## ABSTRACT

---

In general terms, remodeling is a concept that is used to describe modifications, alterations or transformations that occur at the level of the structure of an organ or tissue including its molecular components. In asthma, the remodeling process has been described as structural and molecular changes of the airways. It has been emphasized in the study of the molecular remodeling of the focal adhesions of smooth muscle because this tissue is the main protagonist of the pathophysiology of asthma. This remodeling includes a space-time reorganization of adhesion molecules and receptors, such as Integrin's, and adapters, such as Caveolin, Talina and Paxilin. However, it has been recognized that the role of structural and molecular remodeling in the pathophysiology of asthma is unclear. In the present study we evaluated the effect of smooth muscle remodeling on a model of allergic asthma in the guinea pig. For this, guinea pigs sensitized and challenged with antigen (ovalbumin) were used. The guinea pig control group received saline instead of the antigen. Antigenic challenges administered every ten days induced broncho obstruction and hyperresponsiveness, proliferation of goblet cells in bronchial epithelium and vascular smooth muscle hyperplasia in the third antigenic challenge. In vascular smooth muscle hyperplasia was accompanied by a decrease in Caspase-3 expression. Paradoxically, smooth muscle of the airways did not show hyperplasia or hypertrophy, nor was airway fibrosis characteristic of the remodeling of this tissue. At the molecular level, flow cytometry analysis in tracheal myocytes of the asthma model group showed a high number of cells positive to Caveolina-1 compared to the control group. This increase was demonstrated by western blot. Airway obstruction and hyperresponsiveness correlated with increased expression of Caveolin-1 in myocytes ( $P < 0.05$ ,  $r = 0.69$  and  $-0.52$ , respectively). A protein associated with Caveolina-1, the integrin  $\beta 1$  subunit, was observed, through immunohistochemical studies and immunoelectronic microscopy, to share the same distribution in structures in the airways including non-cellular zones of the lamina propria. Further analysis showed

that the integrin  $\beta$ 1 subunit contained both the cytosolic and extracellular domains distributed in the non-cellular regions. Several polypeptides with similar molecular weights were detected by antibodies against the cytosolic and extracellular domains in myocytes of the airways and in the connective tissue surrounding the smooth muscle band without showing changes between the control and asthma models. In the tracheal smooth muscle, studies in flow cytometry and western blot showed that the expression of the cytosolic and extracellular domains of the integrin  $\beta$ 1 subunit was also similar in both groups. However, an increase in *ITGB1* mRNA was observed in tracheal myocytes in the guinea pig group of the asthma model, although the RACE-PCR analysis of *ITGB1* in tracheal myocytes did not show alternative splicing variants. Protein expression levels associated with the integrin  $\beta$ 1 subunit such as integrin linked kinase (ILK) and Paxilin decreased in the guinea pigs of the asthma model, but not those of Talina or  $\alpha$ -Actin. Similarly, levels of an ILK-associated protein, myosin phosphatase subunit 1 (MYPT1) phosphorylated in Thr<sup>696</sup>, were increased in guinea pigs in the asthma model. Our data suggest that, although was observed epithelial remodeling in the airway and structural epithelial remodeling in vascular smooth muscle, no changes were observed in smooth muscle structure of the airway. However, at the molecular level, smooth muscle of the airways showed changes in the expression of Caveolina-1, ILK, Paxilin and MYPT1. On the other hand, the integrin  $\beta$ 1 subunit appears to be secreted into the wall of the guinea-pig airways, although this secretion does not change in the asthma model, but appears to be associated with an alteration in the protein assemblage at focal adhesions as ILK and Paxilin suggesting a process of molecular remodeling of these focal adhesions.

## INTRODUCCIÓN

---

### VÍAS AÉREAS

La principal función de las vías aéreas es llevar el oxígeno hasta la región de intercambio de gases del pulmón donde el oxígeno difunde a través de las paredes de los alveolos para llegar a la sangre que circula por los capilares alveolares (David A. and Wagner G., 2012). Además, las vías aéreas tienen como función calentar el aire, humectarlo y limpiarlo de impurezas para mantener la esterilidad y prevenir infecciones, así como sus consecuencias adversas (Welsch U., 2008). Las vías aéreas son muy susceptibles a daño ante humo de tabaco, polvo industrial, así como patógenos específicos que atacan o destruyen sus mecanismos de defensa y causan una alteración de su función. El aparato respiratorio inicia desde de la nariz y la boca, a través de las vías aéreas conductoras situadas dentro de la cabeza y el tórax, hasta los alveolos, donde tiene lugar el intercambio respiratorio de gases entre los alveolos y la sangre capilar que fluye a su alrededor (David A. and Wagner G., 2012).

Las vías aéreas están compuestas de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran más profundamente en el pulmón (West J., 2002). En base a su estructura, las vías aéreas se clasifican en superiores e inferiores. Las vías superiores están conformadas por las cavidades nasales, senos paranasales, faringe y laringe, mientras que las vías inferiores están conformadas por tráquea, bronquios, bronquiolos y bronquiolos respiratorios (Figura 1). En base a su histología la pared de la tráquea y bronquios está compuesta por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes, glándulas subepiteliales, tejido conectivo, músculo liso y placas de cartílago. Por su parte, los bronquiolos se caracterizan por presentar un epitelio cuboidal pseudoestratificado ciliado con células clara, tejido conectivo, músculo liso con ausencia de glándulas y cartílago (West J., 2002). Como se muestra en la Figura 2,

indicado por las flechas, todos estos componentes de la pared de las vías aéreas van disminuyendo conforme éstos penetran hacia las zonas distales.

Las vías aéreas son susceptibles de presentar enfermedades. En primer lugar a nivel mundial se encuentra el asma, en segundo lugar el EPOC, en tercer lugar las infecciones respiratorias agudas, en cuarto lugar la tuberculosis y finalmente, en quinto lugar, el cáncer de pulmón según lo reportado en el Foro de Sociedades Internacionales de Enfermedades Respiratorias en el 2014 (e-ISBN: 978-1-84984-057-6).

#### ASMA

La palabra “asma” es una palabra griega utilizada por Hipócrates para designar síntomas como jadeo o falta de aliento, por lo que cualquier individuo con esta característica era clasificado como asmático. El concepto fue modificado a finales del siglo XIX, cuando se definió al asma como “disnea paroxística de un carácter peculiar con intervalos de respiración sana entre los ataques” (Holgate S., 2010). En la actualidad el asma se define como una enfermedad heterogénea caracterizada por inflamación crónica de las vías aéreas y la historia de los síntomas respiratorios tales como sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos que varía a través del tiempo en intensidad con una limitación del flujo de aire espiratorio (Kim H. et al., 2010; Lloyd C. and Hessel M., 2010; GINA 2015).



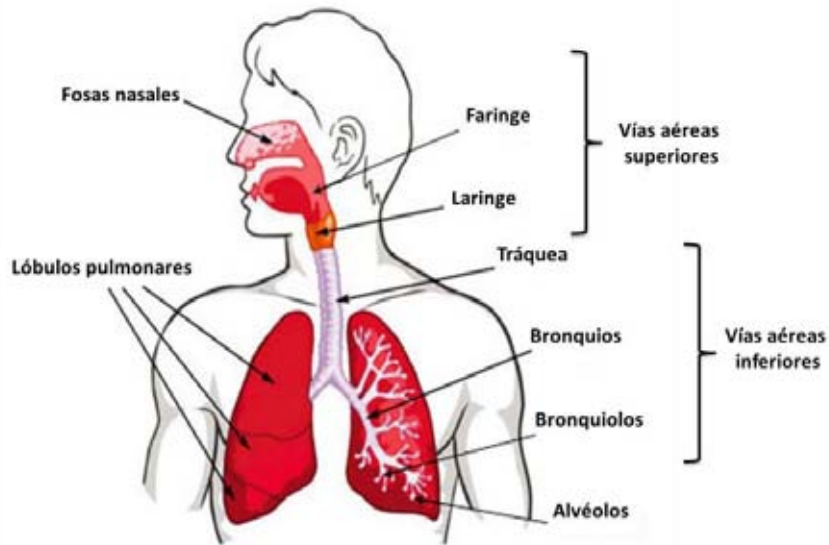


Figura 1. Estructura de las vías aéreas en humano. Las vías aéreas se dividen en superiores e inferiores. Las superiores integran desde las fosas nasales hasta la laringe, mientras que las inferiores desde la tráquea hasta los bronquiolos. Modificado de <https://in.pinterest.com/pin/428264245788766309/>

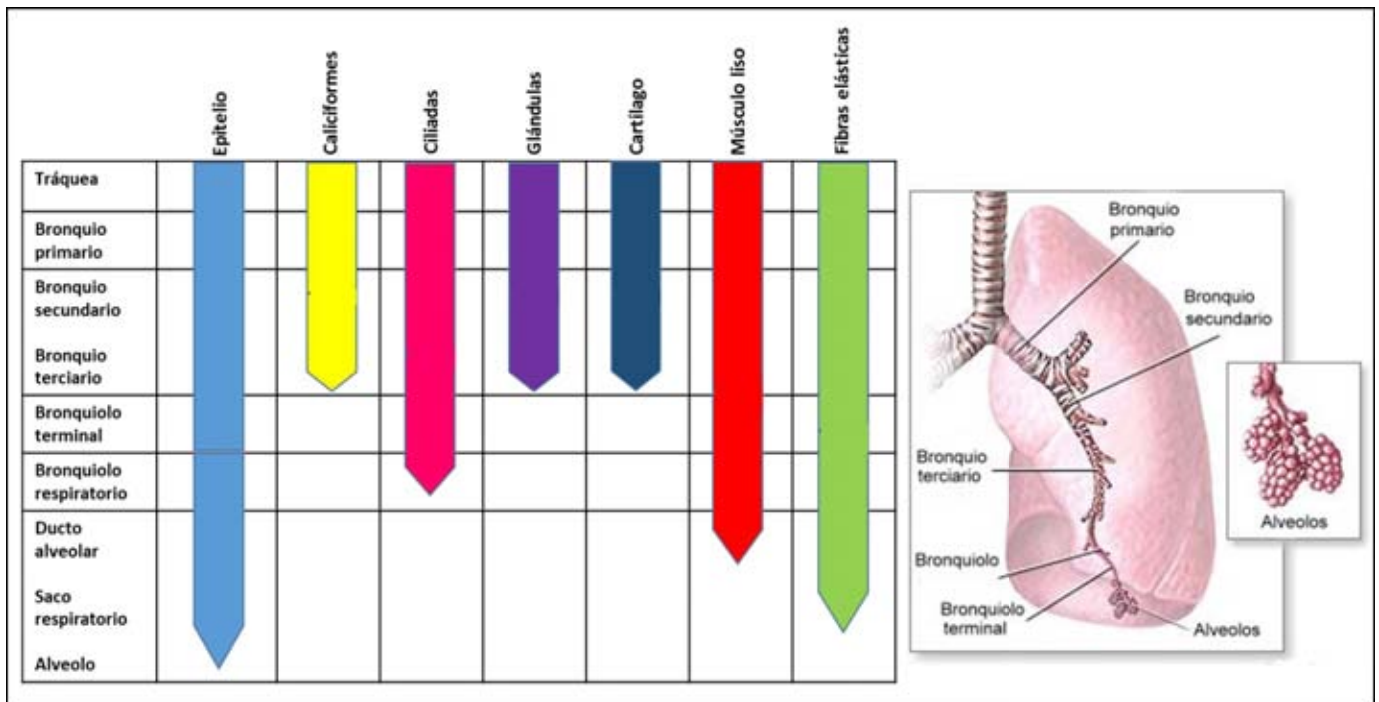


Figura 2. Estructura de la pared de las vías aéreas. Las flechas indican hasta que estructura de la vía aérea se presenta cada componente, desde epitelio hasta las fibras elásticas. Modificado de <http://myanatomymentor.com/2014/09/>

## EPIDEMIOLOGÍA DEL ASMA

En la actualidad el asma es un problema de salud pública mundial ya que afecta entre 1 al 18% de la población de diferentes países (GINA 2015). Según la OMS, la tasa de mortalidad del asma es relativamente baja en comparación con otras enfermedades crónicas. En 2005 fallecieron 255,000 personas por este padecimiento. La OMS ha calculado que en la actualidad hay 235 millones de pacientes con asma y afecta a 30 % de los niños y 10 % de los adultos del mundo, lo que produce una importante carga social y económica, ausentismo escolar y laboral, limitación en las actividades físicas y un mayor uso de los servicios de salud. Además, el asma está presente en todos los países, independientemente de su grado de desarrollo. No obstante, más del 80% de las muertes por asma tienen lugar en países de ingresos bajos y medios-bajos (OMS, 2016).

En México, el asma constituía la decimotercera causa de morbilidad en 2008. El análisis de la morbilidad por grupo de edad, de acuerdo con los casos notificados a la Secretaría de Salud en ese mismo año, muestra que la tasa más alta la tiene el grupo de edad de 0 a 4 años (732.6 casos por 100,000 habitantes), seguida por el grupo de 5 a 9 años (540.8 casos por 100,000 habitantes). Los grupos de edad con menos tasa son el de 15 a 19 años (142.1 casos por 100,000 habitantes) y el de 20 a 24 años (136.9 casos por 100,000 habitantes). A partir de esta edad se incrementa la morbilidad hasta alcanzar la tasa de 215.7 casos por 100,000 habitantes en el grupo de edad de 60 a 64 años. En el grupo de 65 y más años, la tasa es de 119.4 casos por 100,000 habitantes. En nuestro país, a pesar de que la tasa de mortalidad por asma es baja (<1.5 por 100,000 habitantes en 2006), la morbilidad es tan alta que ocasiona una gran carga a los servicios de salud (morbilidad promedio 2003-2009 de 283.3 casos por 100 000 habitantes). Con base en estas cifras se considera que el asma es una causa importante de enfermedad en la población mexicana de adultos y que no ha sido estudiada extensamente (García-Sancho C. et al., 2012).

## FENOTIPOS DEL ASMA

El asma es una enfermedad heterogénea con diferentes procesos fisiológicos y patológicos para el desarrollo de ésta. Características demográficas, clínicas y/o fisiopatológicas se han agrupado para la formación de los fenotipos de asma (GINA 2015; Ying S. et al., 2006; Kim H. et al., 2010; Shin Y. et al., 2009). Muchos fenotipos se han identificado, algunos de los más comunes incluyen:

- Asma alérgica. Éste es el fenotipo de asma más fácilmente reconocible y a menudo inicia en la infancia y está asociada a una historia de familiares con enfermedades alérgicas. El examen de esputo inducido a los pacientes revela inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Los pacientes con este fenotipo de asma por lo general responden bien al tratamiento de corticoesteroides inhalado.
- Asma no alérgica. Algunos individuos presentan un tipo de asma que no está asociado a un proceso alérgico. El perfil celular del esputo de estos pacientes puede ser neutrofílico, eosinofílico o contener unas pocas células inflamatorias. Los pacientes con asma no alérgica responden menos al tratamiento de corticoesteroide inhalado.
- Asma tardía. Algunos adultos particularmente mujeres presentan este tipo de asma en las primeras etapas de la vida adulta. Estos pacientes tienden a ser no alérgicos y requieren altas dosis de corticoesteroides inhalados y son relativamente refractarios al tratamiento con corticoesteroides.
- Asma con limitación del flujo de aire fijo. Algunos pacientes con asma de larga duración desarrollan una limitación al flujo de aire fijo que se piensa que es debido a la remodelación de la pared de las vías aéreas.
- Asma con obesidad. Algunos pacientes obesos con asma tienen síntomas respiratorios evidentes y poca inflamación de las vías aéreas de tipo eosinofílica.

## ASMA ALÉRGICA

La alergia es la respuesta del sistema inmune a estímulos externos en individuos sensibilizados. Por esta razón se conoce al asma alérgica como extrínseca. El proceso alérgico asociado a este tipo de asma se inicia cuando un alérgeno ingresa a las vías aéreas donde se endocita y procesa por células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas y macrófagos; aunque los basófilos, eosinófilos y mastocitos también pueden llevar a cabo esta función (Kim H. et al., 2010). Los fragmentos del alérgeno son presentados mediante el MHC-II a los linfocitos T vírgenes que se activan, maduran y proliferan como linfocitos T cooperadores del tipo Th2 para luego interactuar con los linfocitos B. Estos últimos son los productores de anticuerpos IgE específicos para el alérgeno. Cuando la IgE se une a su receptor de alta afinidad FcεRI que se encuentra en mastocitos y basófilos, el individuo se ha sensibilizado al alérgeno (Vennera M. and Picado C., 2012). La expresión del asma es un evento posterior que se inicia cuando aparece de nuevo el alérgeno y es reconocido por la IgE que se encuentra en las células sensibilizadas, es decir, cuando hay una re-exposición al mismo alérgeno. Estas células liberan diferentes tipos de mediadores como la histamina, generando tanto respuestas inflamatorias como síntomas respiratorios derivados de la obstrucción de las vías aéreas (Figura 3). La hipersecreción de moco, edema y contracción del músculo liso de las vías aéreas son los principales mecanismos que inducen la obstrucción de las vías aéreas durante una exacerbación producida por el alérgeno. Además, un incremento en el depósito de fibras de colágena y cambios estructurales de las vías aéreas, proceso conocido como remodelación estructural, también contribuye a la obstrucción de las vías aéreas (Vennera M. and Picado C., 2012).

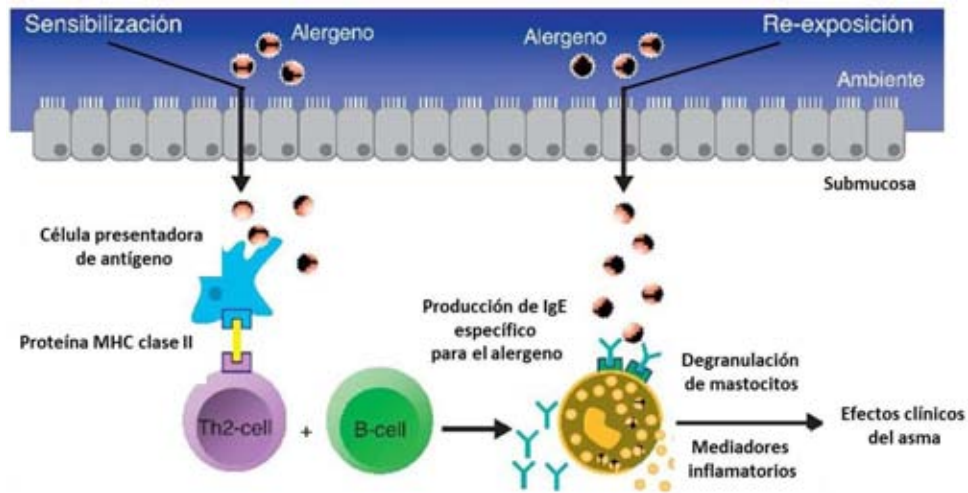


Figura 3. Mecanismos inmunológicos en el asma alérgica. Tomado de Vennera M. and Picado C. (2012).

#### REMODELACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS VÍAS AÉREAS

Una característica adicional del asma son los cambios estructurales de las vías aéreas, que en conjunto se denominan como remodelación estructural de las vías aéreas (Figura 4). Se ha propuesto que la remodelación estructural de las vías aéreas resulta en una función pulmonar deficiente que es caracterizada por engrosamiento subepitelial por el depósito de colágena, descamación epitelial con metaplasia de células caliciformes, angiogénesis, alteraciones en los componentes de la matriz extracelular tales como colágenas, proteoglicanos y glicoproteínas en la pared de las vías aéreas y un incremento en la masa del músculo liso de las vías aéreas (Wiparat M., 2014). Desde el punto de vista funcional, el principal papel del músculo liso de las vías aéreas es la regulación del tono de las vías aéreas a través de un balance entre la contracción y la dilatación en respuesta a factores circulantes o locales. De acuerdo con esto, los factores que producen o incrementan la broncoconstricción con un daño repetitivo de mecanismos de dilatación pueden resultar en un tono de las vías aéreas incrementado que es típico del asma. Además, cambios estructurales inducidos por factores intrínsecos pueden resultar en reducir el lumen de las vías aéreas, llevando a un proceso de obstrucción de mismas (Prakash Y., 2013).

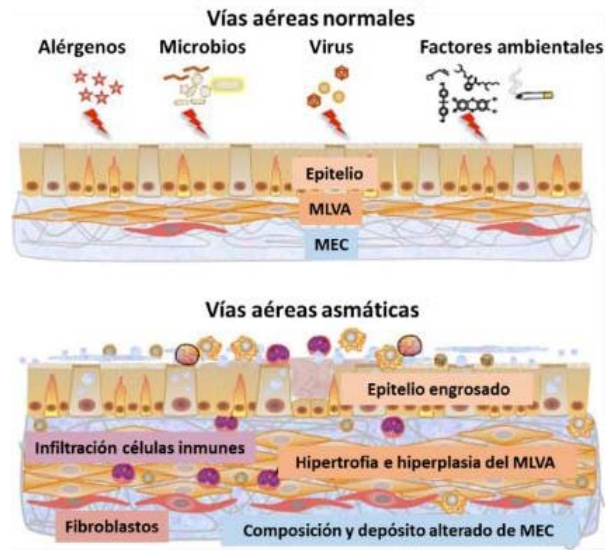


Figura 4. Cambios estructurales en la pared de las vías aéreas. MLVA: Músculo liso de las vías aéreas. MEC: Matriz extracelular. Tomado de Prakash Y. (2013).

#### OBSTRUCCIÓN DE LAS VÍAS AÉREAS

La obstrucción del flujo de aire es la principal alteración funcional causante del asma y da lugar a la crisis o exacerbación asmática. Durante la exacerbación asmática, la obstrucción puede ocurrir en cualquier nivel del árbol traqueo-bronquial, sin embargo, las vías aéreas periféricas son el principal sitio de obstrucción (Burgel P. et al, 2009). La obstrucción es ocasionada por la disminución del calibre de las vías aéreas, especialmente durante la espiración y las principales causas son: 1) formación de edema, 2) hipersecreción de moco, 3) inflamación y 4) contracción del músculo liso, que, hasta el momento, es la principal causa para que se desarrolle la obstrucción (GINA, 2015; Vargas Becerra M., 2009). Durante la exacerbación asmática, la obstrucción del flujo de aire suele ser episódica y generalmente es reversible de manera espontánea o con tratamiento. Sin embargo, en algunos pacientes la obstrucción se vuelve permanente debido al engrosamiento de la pared traqueo-bronquial como resultado de la remodelación estructural y la inflamación crónica, lo que posiblemente contribuye al desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas (Yamauchi K., and Inoue H. 2007).

## HIPERREACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

La excesiva respuesta contráctil del músculo liso de las vías aéreas en el asma resulta en una broncoconstricción desordenada y una obstrucción del flujo de aire en respuesta a relativamente poca provocación. A este fenómeno se le conoce como hiperreactividad de las vías aéreas y es una característica fisiológica típica del asma. Una gran variedad de estímulos físicos y químicos pueden llevar hacia la broncoconstricción. Por ejemplo agonistas colinérgicos, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, endotoxinas, alérgenos, ejercicio, incremento en la masa del músculo liso de las vías aéreas e incremento del tono vagal. Los agonistas contráctiles como metacolina pueden activar directamente receptores en células del músculo liso de las vías aéreas, lo que inicia la contracción de los miocitos y una consecuente broncoconstricción. Esta es la base teórica de exámenes de reto con metacolina usados para diagnosticar el asma. Los individuos que tienen asma, suelen responder más rápido a los retos de metacolina en comparación con los individuos sanos. Actualmente, se sabe que hay contribución de mecanismos que incluyen un incremento en la disponibilidad de mediadores contráctiles como la histamina proveniente de mastocitos en las vías aéreas de asmáticos, además de un incremento de la masa del músculo liso de las vías aéreas (Doeing C. and Solway J., 2013). Otra explicación para la hiperreactividad de las vías aéreas incluye el aumento en el calcio libre intracelular que a su vez incrementa la contractilidad celular del músculo liso de las vías aéreas (Hakonarson H. and Grunstein M., 1998), así como la activación de la vía de la cinasa de Rho (Schaafsma D. et al., 2008; Chiba Y. et al., 2010). El incremento en los niveles de proteína de RhoA ha sido identificado en modelos animales de asma alérgica (Chiba Y. et al., 1999; Chiba Y. et al., 2005; Schaafsma D. et al., 2004) y la inhibición de la vía de la cinasa de Rho-RhoA pueden prevenir o revertir la hiperreactividad de las vías aéreas (Schaafsma D. et al., 2006; Schaafsma D. et al., 2008).

## MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

El músculo liso de las vías aéreas participa en varios procesos patológicos del asma. La contracción exagerada de este tejido es el principal mecanismo para que se lleve a cabo la hiperreactividad de las vías aéreas, además de participar en la perpetuación de la inflamación y en la remodelación de las vías aéreas (Moore C. et al., 2010; Cockcroft D. and Davis B., 2006; Pelaia G. et al., 2008). Las propiedades mecánicas del músculo liso de las vías aéreas son fundamentales para la regulación de sus funciones, particularmente en el caso del asma, es importante entender el proceso de contracción del músculo liso.

## CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

La contracción del músculo depende del incremento de la concentración de iones de Calcio en el citoplasma ( $[Ca^{2+}]_i$ ). El mecanismo de contracción resulta de la despolarización de la membrana plasmática llevando a un flujo interno de  $Ca^{2+}$  por medio de la vía de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Se ha visto que el potencial de membrana de las células del músculo liso de las vías aéreas oscila espontáneamente, generando las llamadas ondas lentas (Thirstrup S., 2000). Las ondas lentas generalmente no llegan a un potencial de acción por una rectificación muy fuerte que contrarresta cualquier tendencia de despolarización. Estas corrientes rectificantes están mediadas por la apertura de canales de gran conductancia de  $Ca^{2+}$  y especialmente por canales de Potasio rectificadores dependientes de voltaje, que son responsables de la repolarización e hiperpolarización, lo que confiere una gran estabilidad eléctrica a esta célula muscular (Figura 5A) (Pelaia G. et al, 2002). La generación de potenciales de acción en espiga y la consecuente activación de los canales de calcio operados por voltaje (VOCC) pueden ocurrir en estas células musculares lisas sólo cuando se bloquean experimentalmente los rectificadores de potasio. De hecho, se ha observado que el  $Ca^{2+}$  que proviene de los reservorios intracelulares es el principal contribuidor



para el inicio de la contracción del músculo liso de las vías aéreas (An S. et al., 2007; Pelaia G. et al., 2008; Kim H. et al., 2008).

En el músculo liso de las vías aéreas existen múltiples vías para el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 5B). Por ejemplo, el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  por la acción de la acetilcolina (Liu X. and Farley J., 1996; Pérez J. and Sanderson M., 2005), activa receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que están asociadas a  $G\alpha_q$ . La proteína  $G\alpha_q$  cargada con GTP activa a su efector río abajo, la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC $\beta$ ), que a su vez hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para producir inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se une a los receptores de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) del retículo sarcoplásmico para liberar al  $Ca^{2+}$  hacia el citosol (Bergner A. and Sanderson M., 2002; Kannan M. et al., 1997). Otro tipo de receptores del retículo sarcoplásmico, los de rianodina (RyR), que son activados por el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, se ha visto que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L permite que este ion se una a los RyR, liberando  $Ca^{2+}$  y amplificando la señal. A este mecanismo se le ha llamado liberación de  $Ca^{2+}$  inducido por  $Ca^{2+}$  (Figura 5B) (Dai J. et al., 2006; Kip S. et al., 2006). En el músculo liso de las vías aéreas la apertura de los VOCC por la estimulación con agonistas no despolariza a la célula lo suficiente a la célula (Janssen L., 2002), por lo que existen otros mecanismos que pueden contribuir al incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ . La entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula puede ocurrir también como resultado del vaciado de los reservorios internos mediante canales de  $Ca^{2+}$  operados por almacén (SOCC) (Parekh A. and Putney J., 2005). El mecanismo que liga la disminución de  $Ca^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico para la apertura de los SOCC no es claro, pero recientes estudios han identificado un sensor de  $Ca^{2+}$ , el STIM1 que se encuentra en la membrana del retículo sarcoplásmico y tiene interacción con una proteína o canal de la membrana plasmática conocida como Orai1 (Parekh A., 2006; Smyth J. et al., 2006).

La entrada de  $Ca^{2+}$  puede también estar influenciado por agonistas de la contracción iniciando tanto la activación de canales operados por receptor o por segundos mensajeros (Figura 5B).



$\text{Ca}^{2+}$  a la célula puede iniciar por dos vías independientes. Una vía es por la activación de proteínas G a través de receptores acoplados a proteínas G y la otra vía por la activación de diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran en la membrana plasmática del miocito. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico es por la activación de los receptores de IP3 y de rianodina. Este último receptor se activa por el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la célula y a su vez permite la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del almacén, a lo que se conoce como incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ . STIM1 se encuentra en la membrana del retículo sarcoplásmico y es el sensor de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . STIM1 se comunica con Orai 1, que se encuentra en la membrana plasmática del miocito. Una vez que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  están elevadas en el citosol, inicia el proceso de contracción del músculo liso de las vías aéreas.

#### MECANISMO QUE SENSIBILIZA A LA MAQUINARIA CONTRÁCTIL DEL MÚSCULO LISO

Un fenómeno interesante de la contracción del músculo liso de las vías aéreas es que su inicio depende de un incremento importante de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pero este incremento es siempre transitorio, pues la contracción se sostiene hasta por mucho tiempo a bajas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , esto es, a niveles solo por arriba de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal (Somlyo A. and Somlyo A., 2003) (Figura 6A). En estas condiciones se ha sugerido que existen mecanismos que sensibilizan la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$  para sostener la contracción (Murray R. et al., 1993).

Por ejemplo, las células del músculo liso tienen gran cantidad de interacciones de entrecruzamiento de actina-miosina durante la contracción muscular. Esta actividad de entrecruzamiento depende del estado de fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina, la cual, está determinada por las actividades antagonistas de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (Figura 6B). La actividad de la MLCK está generalmente en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la actividad de la MLCP depende de una variedad de cinasas y fosfatasas, y su función es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (An S. et al., 2007). En este sentido, la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar relacionada con la regulación negativa de la MLCP, es decir, a los diferentes sitios de fosforilación que inhiben a la subunidad reguladora de la MLCP, lo cual podría imposibilitar a la MLCP para cumplir la función de desfosforilar a la cadena reguladora de la miosina generando una contracción muscular constante (Figura 6B).

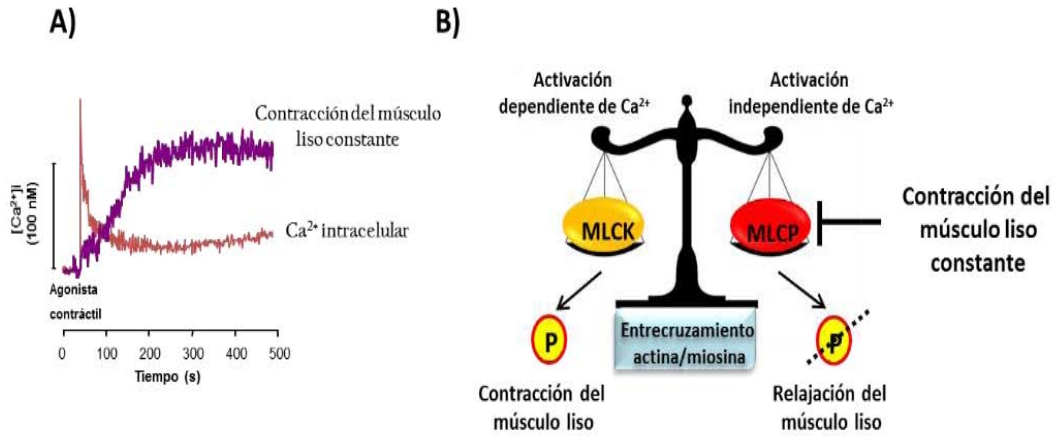


Figura 6. Mecanismo que sensibiliza a la maquinaria contráctil del músculo liso. La estimulación con un agonista contráctil al músculo liso de las vías aéreas induce que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  incrementen, aunque rápidamente bajan a un patrón estable tan sólo un poco mayor a los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$ . La contracción del músculo liso de las vías aéreas permanece constante aun cuando las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se mantienen bajas (A). Un mecanismo que puede explicar la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  es la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (B). P = fosforilación.

Actualmente existe la propuesta que aspectos estructurales también pueden contribuir al desarrollo de la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  como el reciente papel que tienen las caveolas y sus proteínas regulatorias caveolinas y cavininas (Prakash Y., 2013).

#### CAVEOLAS

Las caveolas son invaginaciones de 50-60 nm en forma de matraz y son características de las membranas plasmáticas en muchos tipos celulares, incluyendo adipocitos, células endoteliales y células musculares. Las caveolas generalmente muestran una distribución celular desigual y las proteínas asociadas a las caveolas tienen distintos perfiles de expresión, sugiriendo que poseen funciones altamente especializadas. Varios estudios han revelado una gran diversidad de funciones para la caveola, incluyendo el recambio de lípidos y la organización de la membrana plasmática, dando una plataforma para la regulación de moléculas de señalización y enzimas (Parton R. and del Pozo M., 2013). Las caveolas fueron observadas por microscopía electrónica en los años 50's, mientras que su principal componente, la caveolina-1 (Cav-1) fue identificada 40 años después.

Posteriormente se identificaron a caveolina-2 y caveolina-3 que es específica del músculo. Por último, en la década pasada, se identificó un segundo componente abundante estructural y esencial de las caveolas, las proteínas de la familia de las cavininas (Kovtun O., 2015).

En muchos músculos lisos, la caveola se encuentra en una cercana proximidad al retículo sarcoplásmico, lo cual puede ser de gran importancia funcional dado el papel principal de esta estructura en la regulación de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Además, la periferia del retículo sarcoplásmico puede formar una red continua tubular con la membrana nuclear y después envolver completamente a la caveola (Taggart M., 2001). Estudios de microscopía inmunoelectrónica localizaron tanto a la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  como al receptor  $\text{IP}_3$  en las caveolas del músculo liso (Fujimoto T. et al., 1992). El fraccionamiento subcelular y la inmunoprecipitación de células de músculo liso cultivadas, sugiere una acumulación de receptores para agentes contráctiles en las caveolas (De Weerd W. and Leeb-Lundberg L., 1997). Además, la microscopía de luz de alta resolución sugiere que la actividad del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , está cercanamente influenciado por el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo sarcoplásmico, puede ser enriquecido en regiones caveolares de membranas de células de músculo liso (Moore E. et al., 1993). Con esto, la residencia de las caveolas adyacentes al retículo sarcoplásmico, separados por distancias de 10-40 nm, junto con la localización caveolar de proteínas importantes para la movilización y transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , apoya la hipótesis que estas estructuras plasmalemales pueden estar influenciando en la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso (Isshiki M., 1998) (Figura 7). Por todo lo anterior, la caveola podría ser una región plasmalemal involucrada en la integración de señales extracelulares contráctiles y efectores intracelulares en el músculo liso. Tal coordinación localizada en la membrana de los eventos de transducción de señales permitiría un mecanismo eficiente para el acople de excitación-contracción del músculo liso (Taggart M., 2001).

De las tres isoformas de caveolina, Cav-1 podría facilitar el incremento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y por tanto de las respuestas contráctiles ante un evento inflamatorio (Sathish V. et al, 2011). Por el contrario, una expresión reducida de Cav-1 podría facilitar la proliferación del músculo liso de las vías aéreas (Gosens R. et al., 2008). Por lo anterior, es posible que Cav-1 contribuya a un balance entre un fenotipo contráctil contra un fenotipo proliferativo del músculo liso de las vías aéreas en un contexto de inflamación, lo cual produciría cambios en las vías aéreas como ocurre en el asma. Además, en virtud de su capacidad para interactuar con elementos intracelulares del citoesqueleto, la caveola puede formar nexos o uniones entre estructuras intracelulares y extracelulares (Prakash Y., 2013) y con ello facilitar eventos de señalización como los que están involucrados con las integrinas y con las adhesiones focales (Salanueva I. et al., 2007).

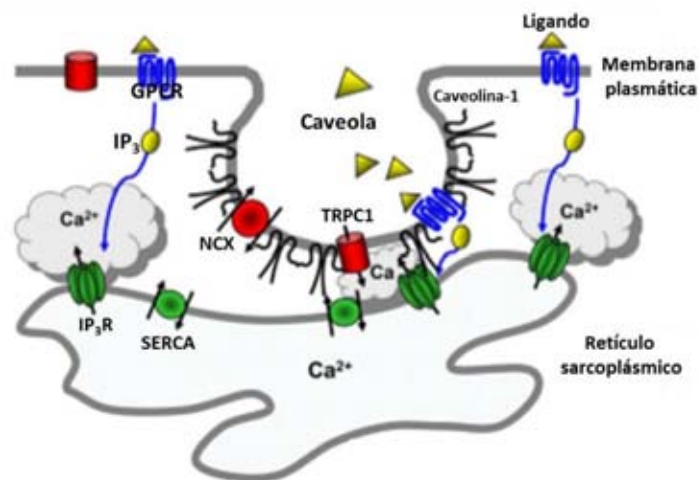


Figura 7. Representación espacial de la caveola y el retículo sarcoplásmico. Se observa la presencia en la caveola de diferentes receptores que participan en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ . GPCR, receptor acoplado a proteínas G;  $\text{IP}_3$ , inositol 1,4,5-trifosfato;  $\text{IP}_3\text{R}$ , receptor de  $\text{IP}_3$ ; SERCA, ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico; NCX, intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; TRPC1, receptor transitorio potencial canal 1. Tomado de Hardin C. and Vallejo J. (2009).

#### ADHESIONES FOCALES

La dinámica de la adhesión celular a la matriz que la rodea es esencial para que ocurran diversos procesos celulares, incluyendo migración, morfogénesis y contracción muscular. Se han descrito dos estados de adhesión a la matriz. El primero es la formación de adhesiones focales

nacientes y el segundo es la maduración de los mismos. Las adhesiones focales nacientes entran rápidamente en un recambio continuo de proteínas para llegar a su estado de maduración, crecen en tamaño e incrementan su fuerza para el anclaje con las fibras de estrés como la actina (Geiger B. et al., 2009). La formación de adhesiones focales es iniciada por interacciones entre integrinas transmembrana y proteínas de la matriz extracelular que llevan a una acumulación dinámica de estructuras de proteínas que forman la adhesión focal en el lado citoplásmico de la membrana. Muchos factores influyen en la composición de las adhesiones focales, incluyendo eventos de señalización que regulan interacciones proteína-proteína involucradas en el ensamble de estos complejos de adhesión focal y propiedades físicas tales como rigidez de la matriz que regula la tensión generada por la contracción. Las proteínas reclutadas a las adhesiones focales son necesarias para transmitir y responder a complejos químicos y señales topográficas de la matriz (Gallegos L. et al., 2011).

Las integrinas orquestan el proceso de remodelación del citoesqueleto que ocurre cuando las células están en movimiento (Wiesner S. et al, 2005). Hay evidencia que un proceso similar de ensamble de complejos de adhesión focal ocurre en respuesta a la estimulación contráctil en músculo liso, y que la formación de este complejo es esencial para la regulación de la polimerización de actina y generación de la tensión inducida por estímulo (Gunst S. and Zhang D., 2008). Proteínas de adhesión, tales como las integrinas, son receptores que se encuentran dentro de plataformas proteolípicas en las membranas plasmáticas de las células del músculo liso. Recientemente se ha observado que ocurren procesos de remodelación molecular en las adhesiones focales y se ha asociado con procesos altamente dinámicos donde hay una reorganización de moléculas de adhesión, receptores y adaptadores que se relacionan directamente con la modulación de la estructura/función. El ensamble de estos complejos supramoleculares está continuamente

balanceado por eventos dinámicos, por adhesiones remodeladas en escalas de tiempo definidas, notablemente por cambios de conformaciones moleculares, etc. (Sergé A., 2016).

## INTEGRINAS

En músculo liso, las uniones de adhesión focal denominadas “cuerpos densos asociados a membrana” se forman cuando en el lado citoplásmico las integrinas se unen a filamentos de actina, y de manera simultánea, en el espacio extracelular a la matriz extracelular (Gunst S. and Zhang D., 2008). En estas uniones, los filamentos de actina están conectados a integrinas vía proteínas adaptadoras de los complejos de adhesión focal tales como  $\alpha$ -actinina, talina, paxilina, filamina, ILK (cinasa ligada a integrina), entre otros. Estos complejos se unen con filamentos de actina que a su vez se unen a la subunidad  $\beta$  de los heterodímeros de integrina (Critchley D., 2000). De esta forma, las integrinas interaccionan con cuerpos densos citosólicos que están compuestos principalmente de actina entrecruzada con  $\alpha$ -actinina (Gunst S. and Zhang D., 2008).

En años recientes se ha propuesto que los complejos de adhesión del músculo liso no son estructuras estáticas. Estudios en músculo liso de las vías aéreas y en células aisladas de músculo liso muestran que la localización de proteínas del citoesqueleto a los complejos de adhesión está regulado de forma dinámica durante la estimulación contráctil (Kim H. et al., 2004; Opazo S. et al., 2004; Zhang W. and Gunst S., 2006). Diversos estudios experimentales han demostrado que la estimulación de la contracción produce el reclutamiento de proteínas estructurales y de señalización hacia la membrana celular del músculo liso, y esto estimula la asociación de proteínas de adhesión con la subunidad  $\beta$  de los heterodímeros de integrina (Kim H. et al., 2004 and Zhang W. and Gunst S., 2006).

La primera integrina descrita fue el receptor de la fibronectina (Pytela, 1985) que, junto con los demás miembros de esta familia, muestran la misma estructura básica: glicoproteínas



transmembranales constituidas por dos cadenas proteicas, o subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . De la subunidad  $\alpha$  se conocen hasta el momento 18 subunidades y 8 de la  $\beta$ , que combinadas producen los 24 heterodímeros de integrina hasta ahora conocidos.

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son proteínas transmembrana tipo I, es decir, contienen un gran dominio extracelular y un pequeño dominio citosólico con 700-1100 y 30-50 residuos de aminoácidos, respectivamente. Todos los dímeros de las integrinas se disocian por detergentes iónicos, indicando que las subunidades están unidas por interacciones no covalentes (Humphries M., 2000). De las 18 subunidades  $\alpha$  conocidas, sólo 8 tienen un dominio I que contiene aproximadamente 200 residuos de aminoácidos y es el responsable de la unión a componentes de la matriz extracelular (Pasqualini R. et al., 1995; Humphries M., 2000). Generalmente hay un exceso de subunidad  $\beta$  en el retículo endoplásmico y la cantidad de subunidad  $\alpha$  determinará la cantidad de receptor que puede ser transportado a la membrana plasmática. Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  libres no se encuentran en la membrana plasmática (Barczyk M. et al., 2010).

La subunidad  $\beta$  de integrina tiene la capacidad de activarse por  $Mg^{2+}$ , lo que la lleva a un cambio conformacional y son capaces de unirse a componentes del citoesqueleto. Por ejemplo, la unión de talina a esta subunidad permite un cambio conformacional para su activación, mientras que la unión de filamina A regula negativamente esta activación (Barczyk M. et al., 2010). Además, se ha observado que la subunidad  $\beta$  no sólo tiene capacidad para unirse a componentes del citoesqueleto, sino también a proteínas citosólicas que están implicadas en la regulación de vías de señalización como la ILK (Attwell S. et al., 2003).

La familia de integrinas  $\beta 1$  está constituida por doce heterodímeros que incluyen de la  $\alpha 1$  a la  $\alpha 11$  y la  $\alpha v$ . Cada una constituye una molécula distinta con diferentes propiedades y características. Las integrinas  $\beta 1$  están ampliamente distribuidas y predominantemente son receptores de moléculas de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno, vitronectina y

laminina (Takada Y. et al., 1988). Los dominios extracelular, transmembranal y citosólico de la subunidad  $\beta 1$  de integrina están codificados en un único gen, *ITGB1* en humanos y el locus se localiza en el cromosoma 10 *p11.22*. En las vías aéreas la subunidad  $\beta 1$  de integrina se expresa en músculo liso, fibroblastos, eosinófilos y linfocitos T (Abraham W. et al., 2004; Nguyen T. et al., 2005). La activación de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en el músculo liso de las vías aéreas por colágena monomérica tipo I y fibronectina regula la capacidad de diferenciación, secreción y proliferación del músculo (Nguyen T. et al., 2005; Peng Q. et al., 2005). Además, en un modelo de asma alérgica en oveja, el tratamiento con anticuerpos contra las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  evita el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas (Abraham W. et al., 2004).

#### ILK

La ILK es una proteína cinasa de serina/treonina que contiene repeticiones de ankirina. ILK Interactúa con el dominio citosólico de la subunidad  $\beta 1$  y  $\beta 3$  de integrina y regula las funciones celulares dependientes de integrinas (Hannigan G. et al., 1996). La ILK se acopla a integrinas y a factores de crecimiento para activar vías de señalización río abajo, aunque en el caso de integrinas, puede ser río arriba también. Estas vías de señalización llevan a la regulación de procesos celulares diversos como el progreso del ciclo celular, supervivencia, división celular y cambios en la morfología (Dedhar S., 2000 and Wu C. and Dedhar S., 2001). Se conoce que la adhesión celular a la matriz extracelular mediada por integrinas induce una reorganización masiva del citoesqueleto de actina, lo que resulta en la formación de adhesiones focales (Petit V. and Thiery J., 2000). Muchas proteínas, incluyendo la ILK así como proteínas estructurales como talina, vinculina y paxilina son reclutadas a las adhesiones focales en respuesta a la adhesión celular lo que lleva a cambios morfológicos y a la activación de vías de señalización (Calderwood D. et al., 2000; Zamir E. and Geiger B., 2001). Por otro lado, se ha observado que una de las vías de señalización dirigidas por la

ILK, es la contracción del músculo liso por la sensibilización de la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$ , esto, mediante la fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP por sus siglas en inglés) (Murányi A. et al., 2002).

## MLCP

La MLCP es un componente regulador clave del proceso de sensibilización de la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$ . La caracterización inicial de MLCP fue reportada desde hace dos décadas a partir de molleja de pollo (Alessi D. et al., 1992). La estructura de la MLCP consta de un heterotrímero compuesto de una subunidad catalítica de fosfatasa tipo 1 (isoforma  $\delta$ ) de 38 kDa (PP1c $\delta$ ), una subunidad reguladora (MYPT1, myosin phosphatase target subunit 1) de 110 kDa y una última subunidad de 20 kDa de función desconocida (M20) (Ito M. et al., 2004; Matsumura F. and Hartshorne D.J., 2008). La MYPT1 interactúa con PP1c $\delta$  en el amino terminal y con M20 en el carboxilo terminal, formando una holoenzima (Somlyo A. and Somlyo A., 2003) (Figura 8). Uno de los sitios más importantes de la MLCP es la subunidad reguladora de MYPT1, ya que esta subunidad está conformada por varios aminoácidos que pueden ser fosforilados. Cuando esto ocurre, la MYPT1 es regulada de forma positiva o negativa de acuerdo a los sitios donde es fosforilada (Kim H. et al., 2008).

## MYPT1

La MYPT1 ha sido clonada en varias especies y se han identificado varias isoformas que contienen cerca de 1000 aminoácidos con una masa aproximada de 110 kDa (Hartshorne D. et al., 1998). Una estructura característica de todas las isoformas de MYPT1 es la región de 7 repeticiones de ankirina en el amino terminal, que se encuentra cerca de un motivo de unión a PP1c $\delta$ . En algunas

isoformas se presentan agrupaciones de 6 o 7 motivos de zipper de leucina en el extremo carboxilo terminal (Ito M. et al., 2004).

El gen de MYPT1 se ha descrito como un gen constitutivo que se expresa en muchos tejidos, aunque se presenta a altos niveles en músculos lisos (Okubo S. et al., 1994, Boudrez A. et al., 1999). MYPT1 está codificado por un simple gen en el cromosoma de humano 12q15-q21.2 (Takahashi N. et al., 1997). Las isoformas están dadas por eventos de empalme alternativo de dos exones generando 4 isoformas principales, que difieren en la presencia de un inserto central y/o un motivo de zipper de leucina en el carboxilo terminal de MYPT1 (isoformas LZ<sup>+</sup> y LZ<sup>-</sup>) (Dirksen W. et al., 2000; Khatri J. et al., 2001). En la MYPT1 de pollo hay dos isoformas que difieren en la ausencia o presencia de un exón central de 123 nucleótidos. La denominada M130 corresponde a la ausencia del inserto central, mientras que la M133 concierne a su presencia (Shimizu H. et al., 1994). En rata, el exón alternativo encontrado en pollo es constitutivo y dos exones río abajo de forma inmediata son alternativos, resultando en 5 isoformas del inserto central (Dirksen W. et al., 2000). La isoforma que contiene el inserto más largo, originalmente reportada como rat3 es equivalente a MYPT1 de humano (Johnson D. et al., 1997). Las otras variantes por empalme alternativo refleja la presencia o ausencia de los motivos de zipper de leucina en el carboxilo terminal. En el pollo, el salto del nucleótido 31 en el exón 24 genera una isoforma positiva para el zipper, mientras que la inclusión del nucleótido 31 cambia el marco de lectura induciendo un codón de paro prematuro y resultando en la isoforma negativa para el zipper (Dippold R. and Fisher S., 2014).

Uno de los aspectos importantes de MYPT1 es que es una plataforma de interacción para múltiples ligandos. La interacción más conocida es la de MYPT1 con la miosina fosforilada, que promueve el proceso de desfosforilación de la misma miosina y por lo tanto la relajación del músculo liso. En este sentido, el sitio de unión para miosina está dentro del amino terminal donde se encuentran las repeticiones de ankirina (Ichikawa K. et al., 1996; Hirano K. et al., 1997). Se ha

sugerido que la unión de la cadena ligera de miosina fosforilada con esta región podría reducir la  $K_m$  de PP1c $\delta$  por su sustrato (Tanaka J. et al., 1998). Por otro lado, se ha propuesto que la fosforilación de Thr<sup>850</sup> (Thr<sup>853</sup> en MYPT1 de humano) por la cinasa de Rho (ROK) reduce la unión a la miosina (Velasco G. et al., 2002). Otras interacciones con MYPT1 incluyen la unión de RhoA activo (unido a GTP) a la región carboxilo terminal de MYPT1 (Kimura K. et al., 1996). No se sabe si esta unión tiene algún papel fisiológico pero podría representar un sitio de unión alternativo en la membrana plasmática (Surks H. et al., 1999). La inhibición de la MLCP se lleva a cabo a través de varios mecanismos (Hartshorne D. et al., 1998; Somlyo A. and Somlyo A., 2003) siendo uno de los principales la fosforilación de la MYPT1.

#### FOSFORILACIÓN DE LA MYPT1

La primera cinasa identificada que lleva a cabo la fosforilación de MYPT1 y por tanto la inhibición de la MLCP es la ROK (Kimura K. et al., 1996) (Figura 8), la cual es activada por RhoA estando unida a GTP (Somlyo A. and Somlyo A., 2003). Hay dos sitios principales de fosforilación para ROK en la MYPT1 de aves, Thr<sup>695</sup> y Thr<sup>850</sup> (sitios equivalentes en la MYPT1 de humano, Thr<sup>696</sup> y Thr<sup>853</sup>). Thr<sup>695/696</sup> son sitios de fosforilación inhibitorias (Feng J. et al, 1999). Otras cinasas también pueden fosforilar los sitios inhibitorios en la MYPT1, la cinasa MYPT1K (recientemente nombrada cinasa de MYPT1) (MacDonald J. et al., 2001) y la ILK. La ILK nativa es efectiva inhibiendo la actividad de la MLCP vía fosforilación de su sitio inhibitorio en la MYPT1 (Murányi A. et al., 2002) (Figura 8). En citoesqueleto de plaquetas, la ILK se ha identificado como la principal cinasa que fosforila e inhibe la actividad de la MLCP (Kiss E. et al., 2002). La inhibición de la MLCP correlaciona con el grado de fosforilación en Thr<sup>695</sup>. Además, estas cinasas (ROK, MYPT1K e ILK) pueden fosforilar directamente a la cadena ligera reguladora de la miosina en Ser<sup>19</sup> (sitio fosforilado por MLCK) y están

implicadas en la contracción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del músculo liso (Amano M. et al., 1996; Niiron N. and Ikebe M., 2001).

La MLCP también puede emplear un mecanismo de autoinhibición. Cuando la MYPT1 está fosforilada en Thr<sup>696</sup> o Thr<sup>853</sup>, los residuos fosforilados interactúan con el sitio activo de PP1cδ e inhiben la actividad de la fosfatasa. Se ha observado que tanto la ROK como la ILK fosforilan a Thr<sup>696</sup>, sin embargo, la fosforilación en Thr<sup>853</sup> está regulada exclusivamente por la ROK (Ramachandran C. et al., 2011).

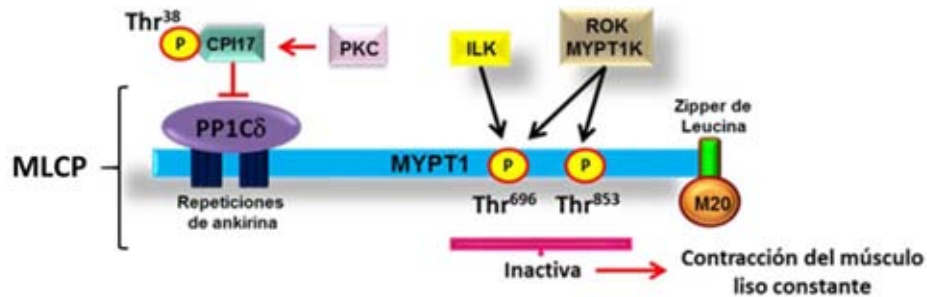


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de la MLCP. Está conformada por una subunidad catalítica (PP1Cδ), una subunidad reguladora (MYPT1) y una última subunidad de 20 kDa (M20). La fosforilación en Thr<sup>696</sup> y Thr<sup>853</sup> (en humano) sobre MYPT1 regula de forma negativa a la MLCP (fosfatasa de la cadena ligera de la miosina), inhibiendo su actividad e impidiendo la desfosforilación de la MLCK (cinasa de la cadena ligera de la miosina), lo que llevaría a la contracción del músculo liso de las vías aéreas en un estado constante. La fosforilación se puede dar por ROK (cinasa de Rho), por MYPT1K (cinasa de MYPT1) y por ILK (cinasa ligada a integrina). Por otro lado, la inhibición de la MLCP se puede llevar a cabo por la inhibición de PP1cδ (subunidad catalítica) mediada por CPI17 (inhibidor de la proteína fosfatasa 1 potenciada por la cinasa C) a través de PKC (proteína cinasa C).

## JUSTIFICACIÓN

---

El cobayo es un excelente modelo experimental para evaluar el desarrollo del asma, ya que las características fisiológicas y patológicas del asma están bien representadas en este modelo animal. La hiperreactividad de las vías aéreas es la característica fisiopatológica más importante del asma, ya que todos los pacientes asmáticos que llegan a una unidad de urgencias es por un evento de hiperreactividad. Sin embargo, hasta el momento no se conocen del todo los mecanismos que la generan. Uno de los mecanismos que podrían explicar el fenómeno de hiperreactividad de las vías aéreas podría ser la remodelación tanto estructural como molecular. En este estudio se evaluarán diferentes mecanismos de remodelación, tanto de cambios estructurales en las vías aéreas como de cambios moleculares en las adhesiones focales en los miocitos en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

## **HIPÓTESIS**

---

La remodelación de las vías aéreas podría estar relacionada con el desarrollo de hiperreactividad en un modelo de asma alérgica.

## **OBJETIVOS**

---

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la remodelación a nivel estructural y/o molecular en miocitos está relacionada con el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

#### **1. Remodelación estructural de las vías aéreas de cobayos del modelo de asma**

Determinar el grado de broncoobstrucción y de reactividad de las vías aéreas de cobayos del modelo de asma.

En estos cobayos evaluar los cambios estructurales en las vías aéreas.

#### **2. Remodelación molecular de las adhesiones focales en miocitos de cobayos del modelo de asma**

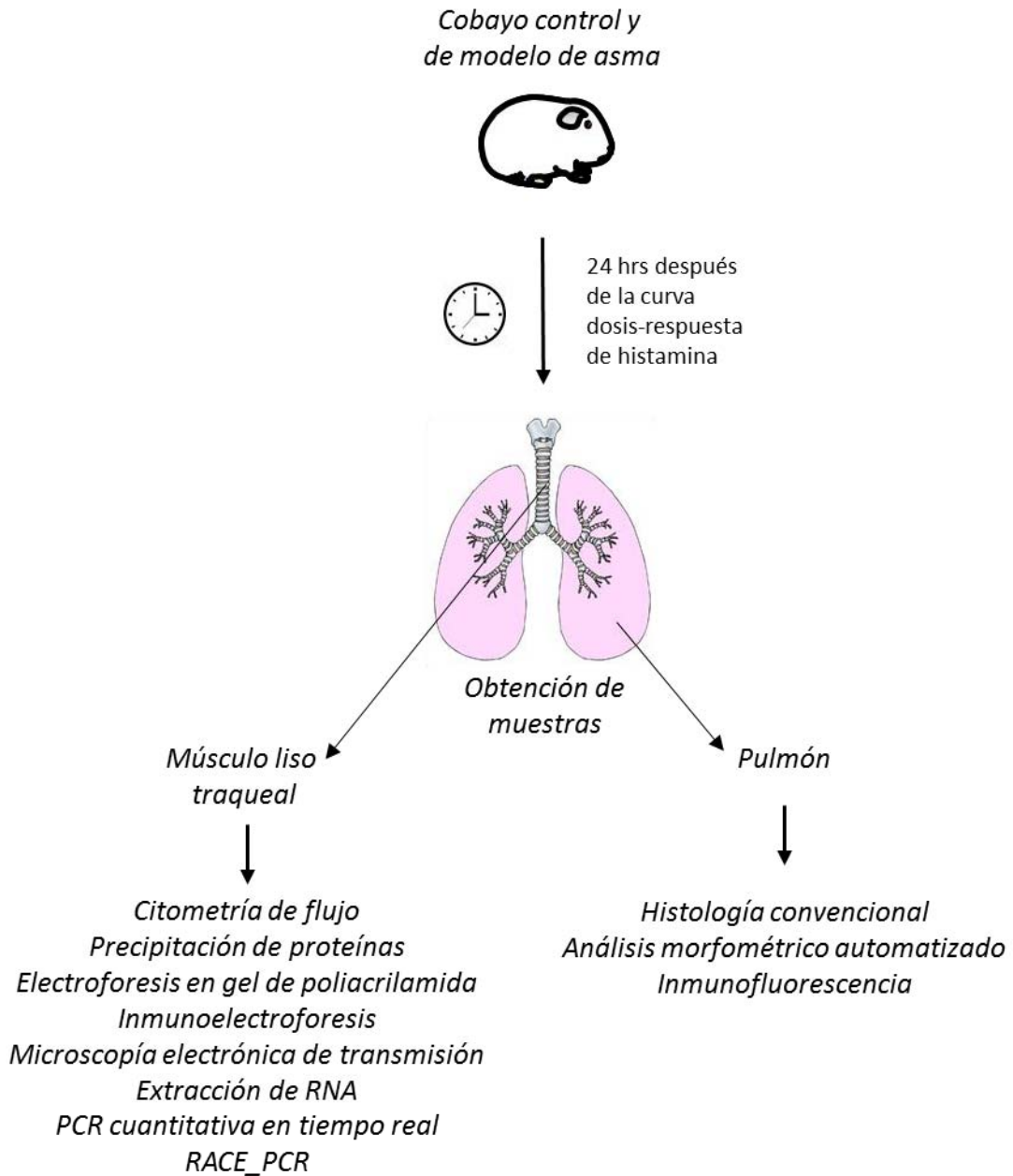
Determinar la expresión de Caveolina-1, subunidad  $\beta 1$  de integrina, ILK, paxilina, talina,  $\alpha$ -actina y MYPT1 en miocitos traqueales en cobayos del modelo de asma.



## METODOLOGÍA

---

A continuación, se muestra el esquema general del desarrollo experimental para la realización de este proyecto.



## ANIMALES

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados de 350 a 400 g que se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación en el bioterio del INER: 12/12 de ciclo luz y oscuridad, aire filtrado a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50-70 % humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Se emplearon dos grupos de cobayos: controles y modelo de asma. Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético y Científico del INER (B37-12, DI/CCB/344/12, 29 de noviembre de 2012).

## SENSIBILIZACIÓN ANTIGÉNICA

Se preparó una solución con ovoalbúmina (OVA; 0.06 mg/ml, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio como adyuvante (1 mg/ml; J.T. Baker, NJ, EU), disueltos en 30 ml de solución salina fisiológica (SSF). En el día 1, se inyectaron a 6 cobayos con 1 ml de la solución de OVA por vía subdérmica e intraperitoneal, mientras que a 6 cobayos controles se les administró una inyección con el mismo volumen, pero únicamente con SSF (Figura 9).

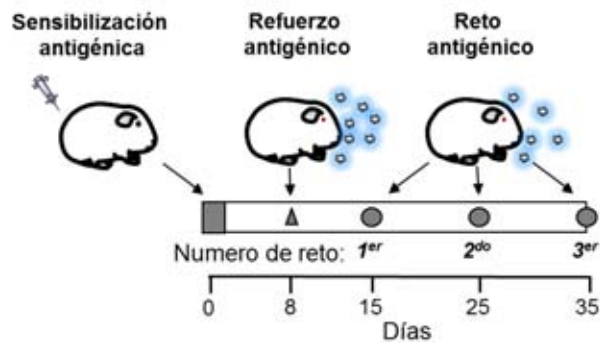


Figura 9. Modelo de sensibilización y administración de retos antigénicos en cobayos.

## PLETISMOGRAFÍA BAROMÉTRICA

En el día 8 se reforzó la sensibilización de los cobayos con OVA (Figura 9). Para esto, se colocó al cobayo dentro de una cámara donde se registró el índice de broncoobstrucción (íB) basal con la ayuda de un pletismógrafo barométrico (Figura 10) para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA). Posteriormente se les suministró aerosoles de OVA (3 mg/ml SSF) durante 5 min con un nebulizador US-Bennett (flujo de 2 ml/min). Este nebulizador produce una mezcla de partículas con la siguiente distribución: el 44% es menor a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, el 38% de 4 a 10  $\mu\text{m}$ , y el 18% mayor a 10  $\mu\text{m}$ . La cámara fue provista de un flujo de aire continuo (10 ml/s), que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. Posteriormente se realizó el registro pletismográfico durante una hora para obtener la respuesta de broncoobstrucción máxima.

El sistema de pletismografía barométrica se basó en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia. Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, Milpitas, CA, EU) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada continuamente por un programa (Buxco Biosystem XA v1.1). Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más, con un tiempo espiratorio mínimo de 0.15 s, tiempo inspiratorio de 3 s y una diferencia máxima entre los volúmenes inspiratorios y espiratorios del 10%. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de no incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada período fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. Cada valor del íB fue el promedio de 15 s de lecturas y, de éstas, el promedio de los últimos 5 min de cada período.

El íB se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y el que está dentro del pulmón del cobayo, debido a que el aire ambiental se calienta de  $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  una vez que está dentro de los pulmones, además también se humidifica al 100%. Los sensores de la cámara de

pletismografía detectan este 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 cobayo exhala el aire. Debido a que el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente, durante la exhalación baja el volumen del aire dentro de la cámara y esto se registra como una disminución en la presión. De esta manera, aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa de la computadora puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y espiración en el equipo previamente calibrado (Hamelmann E. et al, 1997). La información es procesada para dar el valor del íB que es obtenido con la siguiente fórmula:

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

donde:

Te = Tiempo total espiratorio (s)

Tr = Tiempo total de relajación (s)

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

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

Los días 15, 25 y 35 se aplicaron tres retos con el antígeno, el día 15 se administró una solución de 20 mg de OVA disuelto en 20 ml de SSF. Los días 25 y 35 con se administró una solución de 10 mg de OVA disuelto en 20 ml de SSF. Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado durante una hora. Los cobayos control solo recibieron SSF durante los retos.

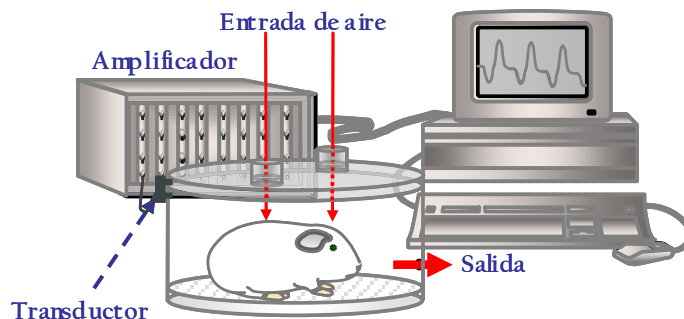


Figura 10. Equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utiliza un transductor de presión diferencial que registrara dichos cambios con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora para su procesamiento.

#### REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS

La reactividad de las vías aéreas fue evaluada en los grupos controles y en el grupo experimental en el tercer reto con OVA (día 35), comparando las curvas dosis respuesta a la histamina antes y después de la administración de OVA. Para esto, inicialmente se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma St Louis, EU) durante 1 min. Para cada dosis se registró el íB durante 5 min continuos y se obtuvo el valor promedio. El intervalo entre la administración de cada dosis fue de 10 min. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una broncoobstrucción que triplicó el valor basal del íB (Dosis provocativa 200 o PD<sub>200</sub>). Después se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un íB aproximado al 50% del valor basal (Bazán-Perkins B. et al, 2004), y se retó con aerosoles de OVA (0.5 mg/ mL SSF, 1 min). La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva.

#### EUTANASIA DE LOS COBAYOS Y EXTRACCIÓN DE TRÁQUEA Y PULMÓN

Veinticuatro horas después de terminada la segunda curva de histamina, los cobayos se eutanasiaron mediante una sobredosis con pentobarbital sódico (28 mg/Kg). Una vez que los

cobayos tuvieron paro cardiorespiratorio, se les realizó una incisión en el cuello para diseccionar la tráquea, a la cual se le eliminó la fascia superficial. El músculo liso traqueal obtenido se procesó para obtener RNA y proteínas. Por otro lado, se obtuvo el pulmón inferior izquierdo para hacer análisis histológicos.

#### HISTOLOGÍA CONVENCIONAL Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO AUTOMATIZADO.

El lóbulo pulmonar inferior izquierdo de los cobayos fue obtenido y fijado por perfusión manual con solución de formaldehído al 10 % vía intra arterial hasta que el lóbulo pulmonar estuviera libre de sangre. Los fragmentos pulmonares obtenidos por corte sagital fueron embebidos en parafina. Algunas secciones pulmonares de 4  $\mu\text{m}$  de grosor fueron teñidas con PAS para hacer determinación de número de células caliciformes, mientras que otras secciones pulmonares fueron teñidas con Tricrómica de Masson para el análisis de morfometría.

Las áreas de superficie  $\mu\text{m}^2$  de músculo liso de las vías aéreas y lámina propia fueron determinadas mediante el uso de morfometría automatizada (Qwin, Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK). Los datos fueron ajustados por el perímetro de la membrana basal correspondiente y su promedio fue considerado el resultado final. Todas las mediciones fueron realizadas en seis bronquios y seis bronquiolos (~100  $\mu\text{m}$  de diámetro) elegidos aleatoriamente en cada cobayo. El total de células epiteliales totales en seis bronquios de cada cobayo se contó y el porcentaje de células caliciformes se obtuvo. Los bronquios y bronquiolos fueron identificados por la presencia o ausencia de cartílago en la pared de las vías aéreas, respectivamente.

#### INMUNOFLUORESCENCIA

Para la detección de caspasa 3 por inmunofluorescencia, el lóbulo pulmonar inferior izquierdo embebido en parafina se cortó en secciones de 4-6  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron incubadas

por 30 min a 55 °C. Las laminillas con el tejido fueron desparafinadas en xileno 2 veces por 10 min cada vez. Las secciones fueron hidratadas gradualmente mediante alcoholes graduados usando 2 cambios por 10 min en cada una de las siguientes soluciones: etanol 100 %, etanol 95 % y agua desionizada. Para la recuperación antigénica, las laminillas fueron cubiertas con 10 mM con buffer de citrato de sodio, pH 6.0 a 95 °C por 5 min. Las laminillas fueron enfriadas en buffer TBS-T por 20 min a temperatura ambiente. Para inhibir la unión no específica del anticuerpo, las laminillas fueron incubadas con 0.2 % de albúmina sérica bovina en PBS por 20 min a 4 °C. Después, la inmunofluorescencia se llevó a cabo por el cubrimiento de cada laminilla con 20 µl de anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 3 (Abcam, San Francisco, CA, USA) por 2 h a 4 °C. Después de lavar en buffer de TBS-T por 5 min, se llevó a cabo la incubación del anticuerpo secundario IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Amish Country, PA, USA) por 30 min a 4 °C. Después de lavar dos veces, las laminillas fueron contrateñidas con medio de montaje y DAPI (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) para identificar en azul los núcleos celulares. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda oscura. En otros experimentos, las laminillas fueron incubadas sólo con el anticuerpo secundario conjugado con FITC, el cual fue usado como control de tinción. Finalmente, las laminillas fueron examinadas por microscopía de fluorescencia con filtros apropiados (Leica DM-LS 2000, Mannheim, Germany) y analizados con el software ImageJ64 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la detección de producción de Caveolina-1 y los dominios intracelular y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en células de músculo liso de las vías aéreas aisladas se empleó triple inmunofluorescencia. Los miocitos aislados fueron incubados con 10 µg/ml de brefeldina A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US) por 4 h para inhibir la liberación de citocinas. Después, las células

fueron lavadas, fijadas con p-formaldehído al 4 % por 10 min a 4 °C, lavadas y permeabilizadas con 0.1 % de saponina en PBS con BSA al 10 % y NaN<sub>3</sub> al 1%. Posteriormente, las células fueron agitadas suavemente en oscuridad por 15 min a temperatura ambiente y 1 x 10<sup>6</sup> células fueron separadas para ser incubadas 30 min con los anticuerpos contra caveolina-1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US), Integrina β1 intracelular (Millipore, Temecula, CA, US) e Integrina β1 extracelular (Millipore, Temecula, CA, US). Luego de lavar, las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado a FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US) y anti-IgG de rata conjugado a PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US). Finalmente, las células fueron lavadas y 10,000 eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Diego, CA, US) analizando mediante el software CellQuest. La intensidad de fluorescencia fue medida en unidades de media de fluorescencia. La fluorescencia inespecífica de cada incubación (tinción de fondo) fue obtenida usando anticuerpos del mismo isotipo dirigidos contra antígenos irrelevantes y conjugados con el mismo fluorocromo. La tinción de fondo fue <1 % y extraída de los valores experimentales.

#### PROTEÍNAS

El músculo liso traqueal fue homogenizado (PRO200; Pro Scientific Inc., Oxford, CT, USA) en buffer de fosfatos (PO<sub>4</sub> 6.7 mM a un pH de 7.4 con KCL 0.04 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM) a 4 °C y sonificado tres veces a 30 U de amplitud por 30 segundos con intervalos de 1 minuto en hielo (Vibra-cell 75185; Sonics and Materials Inc. Newtown, CT, USA). La suspensión fue desalinizada y precipitada a -20 °C en una solución que contiene acetona, 10% TCA y 20 mM de ditiotretitol (DTT). Los botones celulares fueron resuspendidos en buffer de fosfatos a 4 °C. La concentración de proteínas fue determinada con un Kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El extracto de proteínas fue dividido en alícuotas y almacenado a -70 °C hasta su uso.



## ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se obtuvieron los perfiles de proteínas con electroforesis de una dimensión (1D) usando los reactivos y los geles preparados en condiciones reductoras con 2.5% de 2-mercaptoetanol en los geles electroforéticos de 1D, como está recomendado por Laemmli (1970). Las proteínas (30 µg/carril) fueron separadas con un mini-sistema comercial (Mini-Protean II; Bio-Rad) usando 10% de acrilamida/bis-acrilamida (30% T, 2.67% C) a 80 V para concentración y 120 V para separación, usando un Power Pack 3000 (Bio-Rad) de acuerdo con las especificaciones de Harlow and Lane (1999). La electroforesis 1D incluyó marcadores de peso molecular comerciales (Precision Plus Protein All Blue; Bio-Rad) y los geles usados para transferir las proteínas a membranas de PVDF incluyó un marcador de peso molecular estándar (Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards; Bio-Rad). Después de la separación electroforética, los geles se retiraron de la placa de acetato usando una placa (GE Healthcare Bio-Sciences AB) y las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF con una cámara húmeda (XCell SureLock™ Mini-Cell Device) dentro de XCell II™ Blot Module, y NuPAGE Transfer Buffer con NuPAGE Antioxidant por 1 h a 30 V. Las proteínas transferidas a PVDF fueron analizadas mediante western blot.

## INMUNOELECTROFORESIS

La inmunoelectroforesis fue realizada con membranas activadas de PVDF Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) siguiendo instrucciones de manufacturación. Después de transferir, las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas a – 20 °C hasta su uso.

Para el reconocimiento de caveolina- 1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US) se empleó una dilución de 1:1000, para las subunidades β1 de integrina intracelular y extracelular así como ILK y paxilina (Millipore, Temecula, CA, US) se emplearon diluciones de 1:500. Para el reconocimiento de talina (Millipore, Temecula, CA, US) se empleó una dilución 1:1000 y finalmente

para MYPT1 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) fue una dilución de 1:500. Todos los anticuerpos primarios se incubaron a 37 °C por 1 h. Se lavaron las membranas con TBS-T por 5 min 5 veces. Posteriormente se incubaron las membranas por 1 h a 37 °C con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo diluido 1:1000 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), anti-ratón diluido 1:3000 (Millipore, Temecula, CA, US) y anti-cabra diluido 1:1000 (Millipore, Temecula, CA, US) conjugados con HRP. Después, las membranas se lavaron con TBS-T por 5 min, 5 veces. Finalmente, el ensayo de quimioluminiscencia fue realizado con 20X LumiGLO (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA). Después de cada reacción, las membranas PVDF fueron desnudadas a temperatura ambiente.

#### ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Imágenes de geles y reacciones inmunoquímicas de electroforesis 1D fueron registradas y procesadas con Chemidoc XRS Device (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milan, Italy) usando el Software Quantity One 1D Analysis versión 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

#### MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se realizó microscopía electrónica para la localización subcelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en la pared de las vías aéreas. Para esto, cinco animales de modelo de asma se eutanasiaron y se disecaron pequeños fragmentos de la tráquea para ser deshidratados en alcoholes graduados y embebidos en resina hidrosoluble LR-White (London Resin Co., Hampshire, UK). Secciones de 1  $\mu$ m se obtuvieron de 5 bloques diferentes por animal y se tiñeron con azul de toluidina y se revisaron las distintas estructuras que conforman la tráquea usando microscopía convencional. Los tejidos seleccionados fueron ajustados a 70-90 nm de ancho para reducir el área seleccionada de las secciones, colocados en rejillas de Níquel e incubados toda la noche a 4°C con

los mismos anticuerpos específicos para la subunidad  $\beta 1$  de integrina diluidos 1/5 en PBS. Las rejillas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a partículas de oro de 5 nm o 10 nm (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) diluidos 1/20 en PBS. Las rejillas fueron contrastadas con sales de Uranio (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) y examinadas con un microscopio electrónico M-10 Zeiss (Karl Zeiss, Jena, Germany). Como control negativo, el suero normal de conejo fue sustituido por el anticuerpo primario.

#### EXTRACCIÓN DE RNA

Una vez obtenida la banda de músculo liso traqueal, se dejó secar y se obtuvo su peso. Por cada 50 mg de muestra se agregó 1 ml de trizol y se homogenizó en hielo. Por cada ml de trizol, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm por 16 min a 4 °C. En tubos cónicos marca eppendorf nuevos, se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol por cada ml de trizol. En estos tubos se agregó la primera fase de lo obtenido en la centrifugación que corresponde al RNA. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 11 min a 4 °C. Se desechó el isopropanol y se agregó 1 ml de etanol por cada 1 ml de trizol. Se centrifugó a 7500 rpm por 6 min a 4 °C. Se desechó el etanol y se dejó evaporar el etanol que quedó sobre las paredes del tubo por 10 min. Se agregaron 10  $\mu$ l de agua libre de RNAsas y se mantuvo en hielo para su posterior cuantificación.

#### PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Una vez que se cuantificó el RNA, se evaluó la calidad del RNA mediante su resolución en geles de agarosa al 1 % y por la medición de la relación de absorbancia 260/280 nm. 1  $\mu$ g de RNA total se transcribió de forma reversa usando DNasa, buffer DNasa, EDTA (FERMENTAS, Waltham,

Massachusetts), buffer RT 10x, dNTP's 25x, iniciadores al azar 10x, inhibidor RNasa y transcriptasa reversa (High-Capacity cDNA reverse Transcription Kits with RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Grand Island, NY) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando un equipo i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). La PCR se efectuó con una mezcla de trabajo de cDNA en un volumen de reacción de 15 µl conteniendo 2 µl de cDNA, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, buffer MgCl<sub>2</sub> 10x, dNTP's 2 mM, 10 µM de iniciadores específicos 5' y 3', 0.15 µl Taq DNA (Invitrogen, Grand Island, NY), y 10 nM de fluoresceína y tinción SYBR green I diluida 1:50,000 (Roche, Indianapolis, IN). Un par de oligonucleótidos para los genes de *ITGB1* e *ILK* fueron diseñados en Primer BLAST (Tabla 1).

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la RT-PCR cuantitativa**

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
<i>ITGB1</i>	GAGAGTGTATCCAAGCGGGG	ACCCTCAGCACATCCTTCAG
<i>ILK</i>	TGTCACCTGCCACAAGGTGT	AGCCGCACTATTTACCTGAT

Todas las PCRs se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta CT}$  en donde el  $\Delta CT$  se obtuvo CT<sub>gen</sub>-CT<sub>Ri18s</sub>. La prueba estadística que se realizó fue *t* de Student no pareada.

#### RACE-PCR

Se incubaron 10 µg de RNA total con CIP a 37 °C por 1 h. Posteriormente se extrajo el RNA con fenol:cloroformo y después con cloroformo únicamente. Se precipitó con 150 µl de isopropanol en hielo por 10 min y el botón celular se lavó con etanol al 70 % en frío. El RNA se resuspendió en

agua libre de RNAsa y fue tratado con TAP a 37 °C por 1 h. Se ligó un adaptador en el extremo 5' y se incubó a 37 °C por 1 h. Se realizó una reacción Transcriptasa Reversa y se incubó a 42 °C por 1 h. Se ensambló un oligonucleótido externo al extremo 5' y un oligonucleótido específico para *ITGB1* en el extremo 5' a una concentración de 10 µM. Posteriormente se ensambló un oligonucleótido externo al extremo 3' y un oligonucleótido específico para *ITGB1* en el extremo 3' a una concentración de 10 µM. Finalmente se analizaron los productos mediante un gel de agarosa con 1 µg/ml de bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV.

#### MATERIALES

Ovoalbúmina (chicken egg albumin) grado II fue comprado de Sigma Chemical Co. (US). El hidróxido de aluminio fue comprado de J.T. Baker, US. El pentobarbital sódico fue adquirido de Pfizer, México.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

## RESULTADOS

---

### 1. Obstrucción y reactividad de las vías aéreas en cobayos con modelo de asma.

Se evaluó la obstrucción y la reactividad de las vías aéreas en todos los cobayos. En los cobayos con modelo de asma se observó un incremento en la respuesta de obstrucción máxima ante la administración del reto antigénico de OVA (Figura 11A) en comparación con los cobayos controles. Además, mediante la administración de histamina, los cobayos con modelo de asma necesitaron una menor dosis en la segunda curva-respuesta de histamina en comparación con la primera curva-respuesta. Esto sugiere que los cobayos con modelo de asma presentan una mayor reactividad de las vías aéreas en comparación con los cobayos controles (Figura 11B).

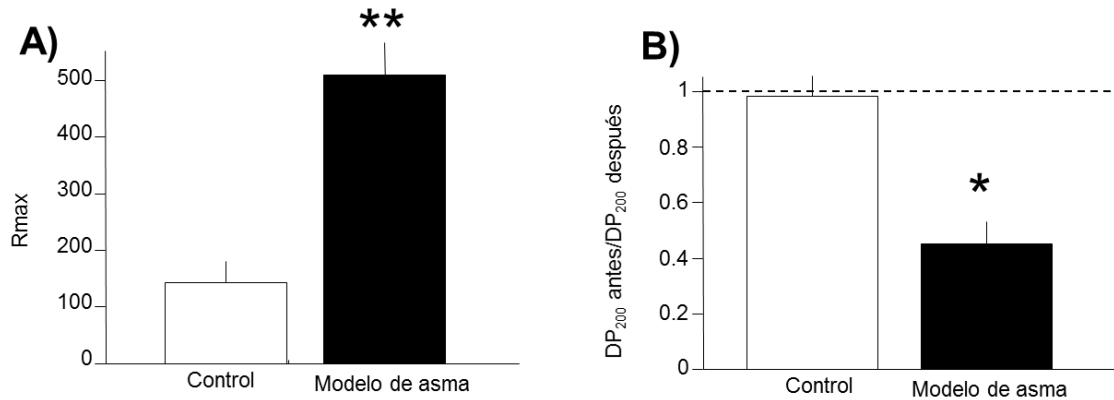


Figura 11. Obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados. A) Promedio de índice de broncoobstrucción máxima (Rmax) inducido por la administración de ovoalbúmina en cobayos del modelo de asma (barra negra) y con solución salina en los cobayos controles (barra blanca). B) el cociente de la DP<sub>200</sub> que corresponde al valor de DP<sub>200</sub> observado después del reto antigénico dividido entre el valor DP<sub>200</sub> antes del reto antigénico. La línea discontinua señala el límite entre la hiporreactividad e hiperreactividad. Las barras corresponden a promedios  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por grupo. \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ ; prueba no pareada de t de Student.

## 2. Remodelación de las vías aéreas de cobayos con modelo de asma.

Para evaluar la remodelación epitelial de bronquios se realizó histología convencional mediante la tinción de PAS. Se determinó que hay un incremento estadísticamente significativo en el número de células caliciformes del epitelio bronquial de cobayos con modelo de asma en comparación con los cobayos controles (Figura 12A). Por otro lado, se realizaron tinciones de tricrómica de Masson para distinguir la capa de músculo liso basado en la tinción rojo fuerte que corresponde al citoplasma y azul que indica fibras de la matriz extracelular (Figura 12B). El análisis morfométrico automatizado de la masa del músculo liso (Figura 12C) y de la fibrosis subepitelial (Figura 12D) de bronquios y bronquiolos no mostraron diferencias significativas entre cobayos controles y con modelo de asma.

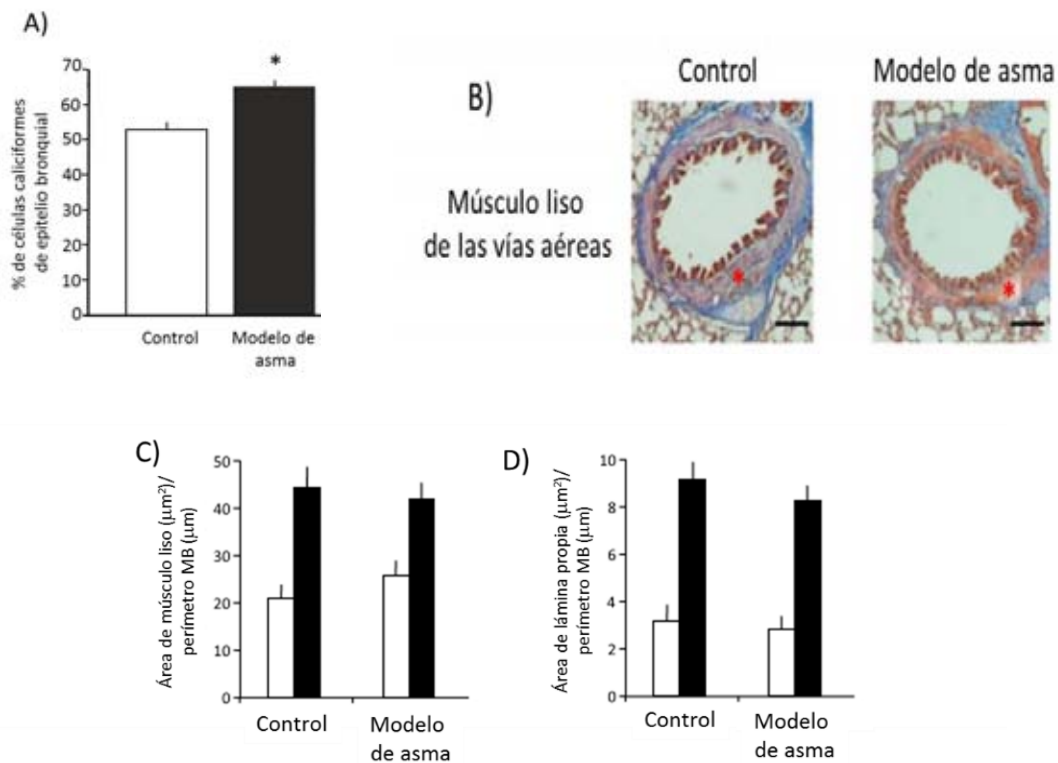


Figura 12. Remodelación de las vías aéreas de cobayos del modelo de asma. A) Porcentaje de células caliciformes en epitelio bronquial. B) Cortes histológicos de bronquios de cobayos controles y con modelo de asma teñidos mediante la técnica de tricrómica de Masson para diferenciar núcleos, citoplasma y fibras de colágena. El asterisco rojo se señala la banda que corresponde al músculo liso de las vías aéreas y las barras negras indican una observación a 40x. C) Área de capa de músculo liso y D) Lámina propia de bronquiolos (barras blancas) y bronquios (barras negras) ajustados por el perímetro de la membrana basal (MB) y medidos por morfometría automatizada. Las barras corresponden a la media  $\pm$  error estándar de  $n=6$  cobayos por grupo. \* $P<0.05$  comparado con el control (prueba de t de Student no pareada).

### 3. Expresión de caspasa 3 en músculo liso de cobayos del modelo de asma.

Cortes de tejido pulmonar de cobayos fueron incubados con el anticuerpo contra caspasa 3. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI que se muestran en azul. Las células positivas para caspasa 3 (células apoptóticas), que se muestran en verde, están distribuidas uniformemente en los bronquios de cobayos controles y con modelo de asma (panel superior observado a una magnificación de 40x). Por el contrario, se observa una disminución significativa de células apoptóticas en vasos pulmonares en cobayos con modelo de asma (panel inferior observado a una magnificación de 20x) (Figura 13).

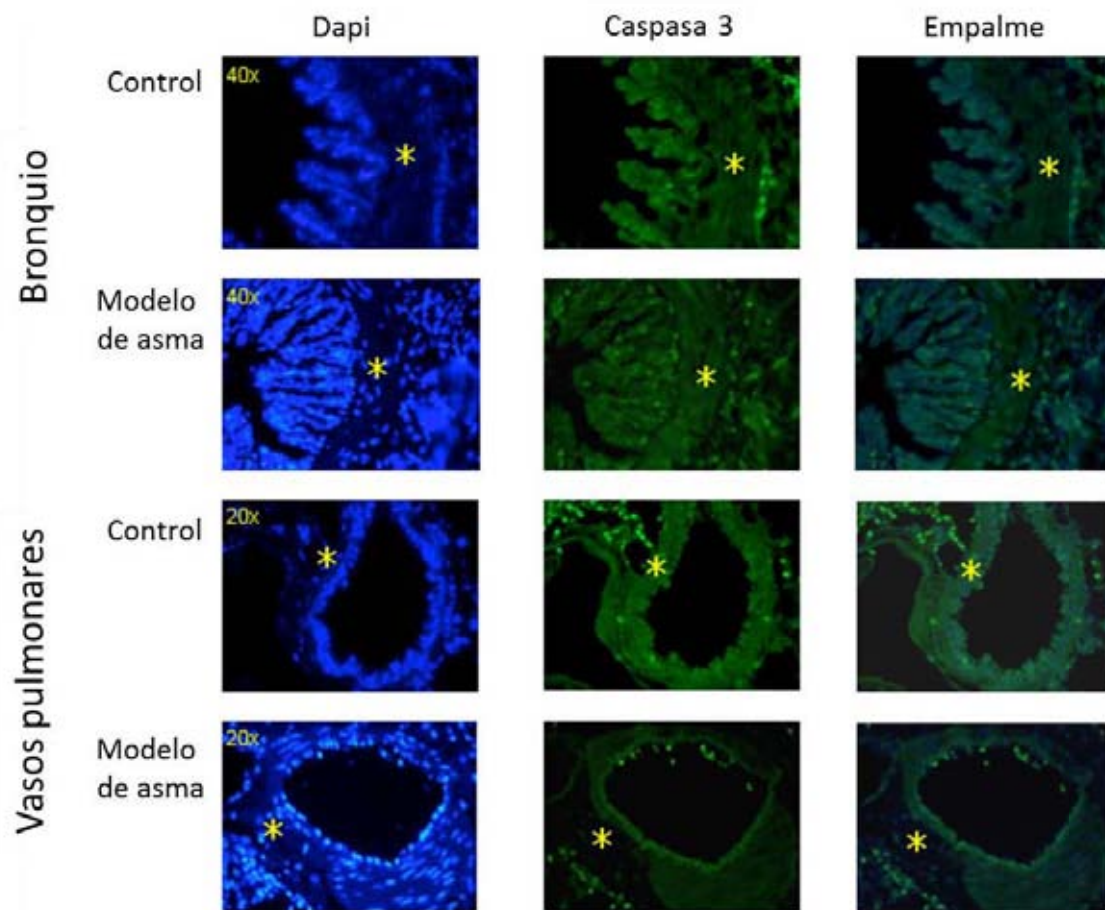


Figura 13. Expresión de caspasa 3 en músculo liso de cobayos del modelo de asma. Imágenes representativas de al menos dos experimentos independientes. \* corresponde a las bandas de músculo liso en bronquios y vasos pulmonares.



#### 4. Expresión de caveolina-1 en cobayos con modelo de asma.

El análisis de la expresión de caveolina-1 en miocitos traqueales mediante citometría de flujo, mostró que hay un incremento significativo en la expresión de caveolina-1 en los miocitos de cobayos con modelo de asma en comparación con los cobayos controles (Figura 14A). Además, por medio de inmunoelectroforesis se observaron dos isoformas de caveolina-1, una de 20 y la otra de 18 kDa. Esta última mostró una disminución en su expresión en cobayos con modelo de asma con respecto al control que fue evaluado mediante densitometría (Figura 14B). Por otro lado, observamos que cambios funcionales en el modelo de asma correlacionó con el número de células de músculo liso que expresaron caveolina-1. Por ejemplo, la hiperreactividad de las vías aéreas mostró una correlación inversa con la caveolina-1 que se expresa en el músculo liso ( $r = -0.517$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 13$ ) (Figura 14C) y la  $R_{max}$  correlacionó con el número de células positivas para Caveolina-1 ( $r = 0.691$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 13$ ) (Figura 14D).

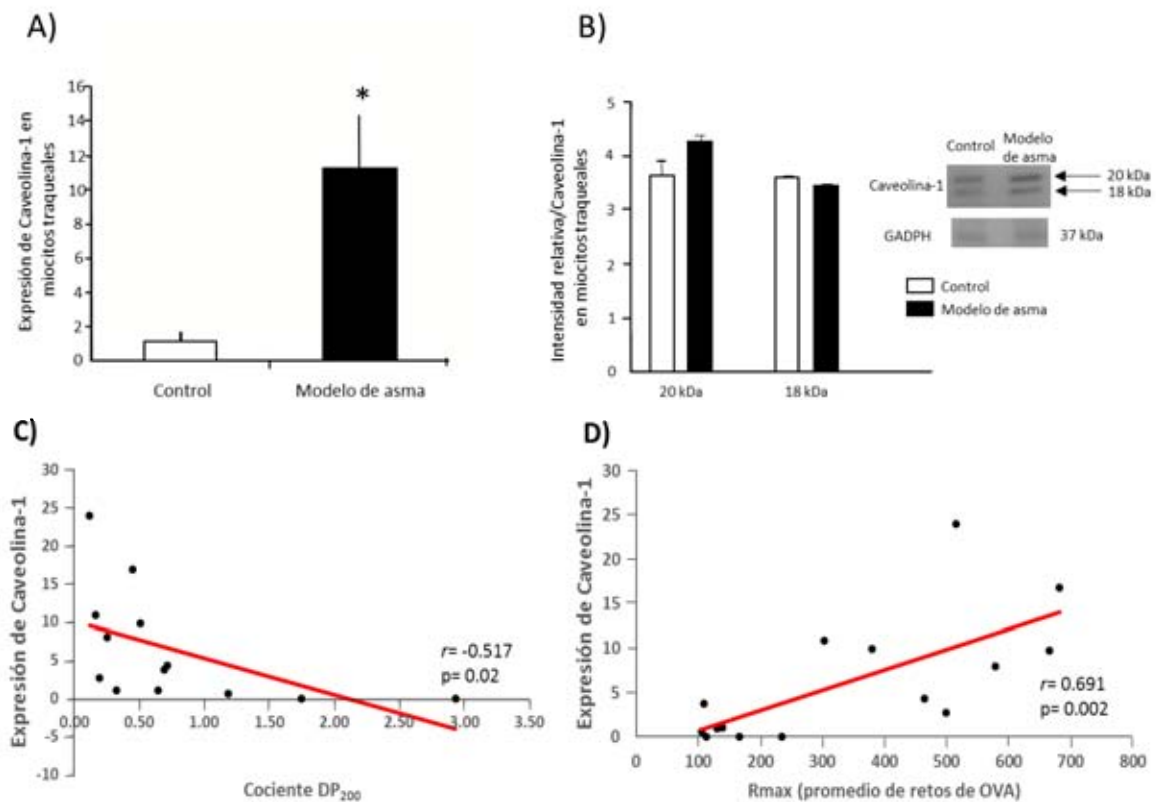


Figura 14. Expresión de caveolina-1 en miocitos traqueales de cobayos del modelo de asma. A) La expresión de caveolina-1 en miocitos traqueales de las vías aéreas evaluado por citometría de flujo ( $n = 6$  por grupo). B) Inmunoelectroforesis representativa de caveolina-1 de miocitos traqueales de las vías aéreas ( $n = 3$  por grupo). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.  $*P < 0.01$  comparado con el control mediante la prueba de t de Student no pareada. C) Gráfico de dispersión mostrando una correlación directa entre la  $R_{max}$  y la expresión de caveolina-1. D) Correlación entre el grado de hiperreactividad de las vías aéreas y la expresión de caveolina-1.  $r =$  coeficiente de correlación de Spearman.

5. Localización de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en la pared de las vías aéreas.

La distribución de los dominios citosólico y extracelular en el músculo liso de las vías aéreas y en el epitelio fue similar en los cobayos con modelo de asma y en los controles. Inesperadamente, el dominio citosólico compartió la misma localización que el dominio extracelular, encontrándose en la capa adventicia y la lámina propia (flecha negra, Figura 15A). Mediante la microscopía electrónica de transmisión, se confirmó que el reconocimiento inmunológico para los dominios citosólico (flechas rojas) y extracelular (flechas blancas) se encuentra asociado a las fibras de colágena que rodean el músculo liso (Figura 15B) y la capa adventicia (Figura 15C).

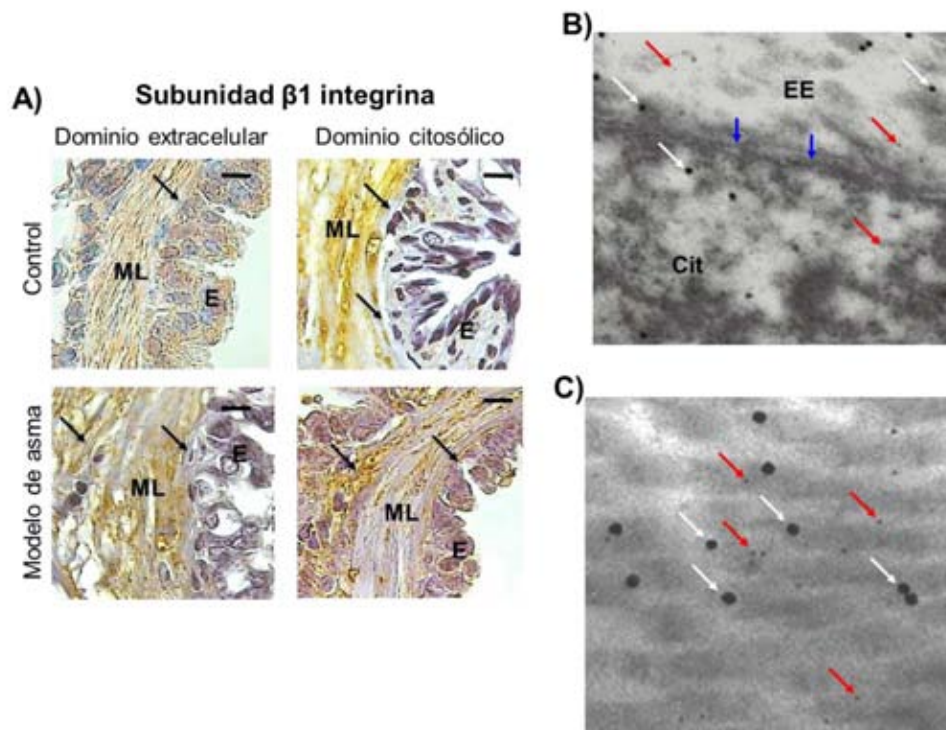


Figura 15. Determinación de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en la pared de las vías aéreas. A) Secciones representativas de la pared de bronquiolos mostrando la tinción del dominio citosólico y extracelular en cobayos con modelo de asma y en controles. La distribución de la tinción entre los grupos fue similar (flechas negras). Las barras corresponden a 10  $\mu\text{m}$ . ML: músculo liso y E: epitelio. B-C) Micrografías representativas de la localización del dominio citosólico (flechas rojas) y extracelular (flechas blancas) determinado por microscopía electrónica después de tres retos de ovoalbúmina. EE: espacio extracelular, Cit: citoplasma de una célula de músculo liso. C) Tejido fibroso de adventicia. Las flechas azules muestran la membrana plasmática de la célula de músculo liso. La magnificación electroscópica corresponde a B) x 31,000 y C) x 80,000.

## 6. Expresión de $\beta 1$ integrina en miocitos traqueales aislados y en tejido conectivo.

Para determinar la expresión de los dominios de la subunidad  $\beta 1$  de integrinas en el músculo liso se realizó citometría de flujo. En el grupo de cobayos con modelo de asma y en los controles el número de células de músculo liso de las vías aéreas que expresan el dominio citosólico de la subunidad  $\beta 1$  de integrina fue similar al número de células que expresan el dominio extracelular (Figura 16A). No se observó correlación entre las variables funcionales con los dominios extracelular o citosólico de la subunidad  $\beta 1$  de integrina (dominio citosólico vs.  $R_{max}$  y cociente  $DP_{200}$ :  $r = 0.31$ ,  $P = 0.13$ , y  $r = -0.30$ ,  $P = 0.14$  respectivamente; dominio extracelular vs.  $R_{max}$  y cociente  $DP_{200}$ :  $r = 0.41$ ,  $P = 0.07$ , y  $r = -0.34$ ,  $P = 0.11$  respectivamente,  $n = 15$ ).

En células de músculo liso aislado y tejido conectivo que rodea el músculo liso traqueal en cobayos controles y con modelo de asma, se usaron anticuerpos dirigidos contra el dominio citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina detectando bandas que corresponden a polipéptidos de 130 y 100 kDa (Figura 16B). La intensidad relativa de las bandas del dominio extracelular y citosólico fue similar en células y tejido conectivo en todos los grupos. En tejido conectivo, los fragmentos polipeptídicos del dominio extracelular con pesos moleculares correspondientes a 50, 55 y 60 kDa incrementaron significativamente en comparación con los fragmentos con pesos moleculares similares detectados para el dominio citosólico en los grupos controles ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$  en cada grupo; Tabla 1). Además, la expresión del polipéptido del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrina con peso molecular de 100 kDa fue más abundante en músculo liso que en tejido conectivo ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$  en cada grupo; Tabla 1).

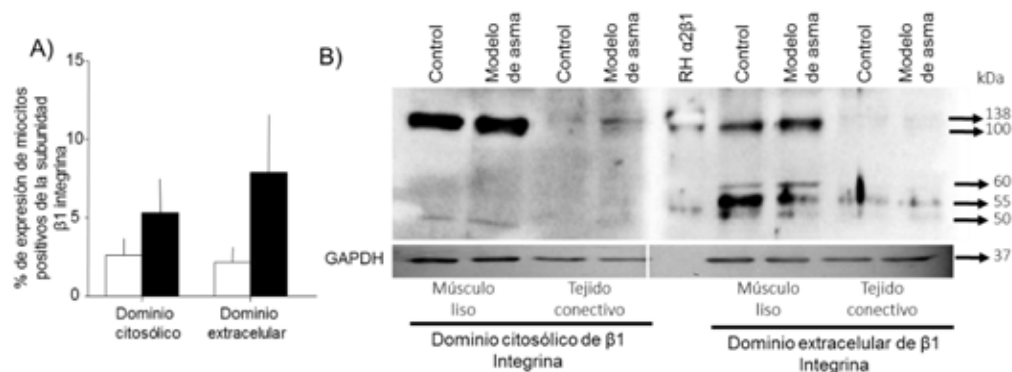


Figura 16. Expresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en miocitos y tejido conectivo de las vías aéreas. A) Expresión de  $\beta 1$  integrina citosólico y extracelular en miocitos aislados de las vías aéreas evaluados por citometría de flujo en cobayos con modelo de asma (barras negras) y control (barras blancas),  $n = 9$  y  $6$ , respectivamente. Las barras representan la media + error estándar. B) Las inmunoelectroforesis representativas de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en células de músculo liso aisladas y tejido conectivo de adventicia de cobayos con modelo de asma y controles.

Tabla 2. Intensidad relativa de los fragmentos polipeptídicos de la subunidad  $\beta 1$  de integrina.

kDa	Dominio citosólico de $\beta 1$ integrina				Dominio extracelular de $\beta 1$ integrina			
	Músculo liso		Tejido conectivo		Músculo liso		Tejido conectivo	
	Control	Modelo de asma	Control	Modelo de asma	Control	Modelo de asma	Control	Modelo de asma
138	-	-	2.2 $\pm$ 0.7	2.4 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.3
100	-	-	1.7 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 1.3	8.9 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.7 <sup>§</sup>	1.5 $\pm$ 0.3
100-138	18.3 $\pm$ 6.6	14.6 $\pm$ 5.6	3.8 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 1.2	9.5 $\pm$ 2.0	11.3 $\pm$ 1.2	7.3 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 0.6
60	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.8*	3.0 $\pm$ 0.7
55	1.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 1.1	3.8 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 1.5	7.8 $\pm$ 2.0	10.5 $\pm$ 1.8	14.0 $\pm$ 2.7**	8.6 $\pm$ 1.6
50	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 0.7*	3.2 $\pm$ 0.5

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  comparado con la expresión del dominio citosólico de  $\beta 1$  integrina en tejido conectivo del grupo control; <sup>§</sup>  $P < 0.01$  comparado con la expresión del dominio extracelular de  $\beta 1$  integrina en músculo liso del grupo control (ANOVA de una vía con la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples). Los valores en la tabla corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

Se determinó la intensidad relativa de los fragmentos polipeptídicos de los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en músculo liso y en tejido conectivo de cobayos con modelo de asma y controles.

### 7. Expresión de *ITGB1* en miocitos traqueales de cobayo con modelo de asma.

Se evaluó la expresión de la subunidad  $\beta 1$  de integrina a nivel génico (*ITGB1*) en el músculo liso de las vías aéreas. Mediante RT-PCR cuantitativa se mostró un incremento en la expresión del gen *ITGB1* en cobayos con modelo de asma comparado con los controles ( $P < 0.001$ ;  $n = 6$  en cada grupo; Figura 17A). Para determinar la existencia de variantes transcripcionales de *ITGB1*, el mRNA de *ITGB1* fue analizado por RACE-PCR. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa y sólo se observó una banda de peso molecular aproximado de 2000 pares de bases tanto en cobayos con modelo de asma como en controles ( $n = 5$  en cada grupo; Figura 17B). Esta banda podría representar la longitud total del gen *ITGB1* que corresponde al reportado en la literatura.

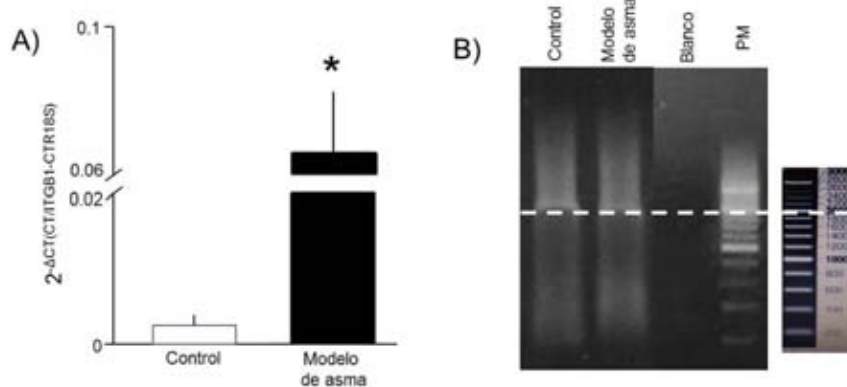


Figura 17. Expresión de *ITGB1* en miocitos traqueales de cobayo. A) RT-PCR. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar en cobayos con modelo de asma (barra negra) y cobayos controles (barra blanca);  $n = 6$  respectivamente.  $*P < 0.001$  comparado con el grupo control (prueba t de Student no pareada). B) Productos del RACE-PCR del gen *ITGB1* evaluados en un gel de agarosa en miocitos traqueales. La figura es representativa de cinco animales por grupo.

8. Expresión de paxilina, talina y  $\alpha$ -actina en miocitos traqueales en un modelo de asma.

Por medio de western blot y con anticuerpos específicos contra Paxilina, se identificaron dos bandas con pesos moleculares de 68 y 50 kDa (Figura 18A). La intensidad relativa de ambos polipéptidos disminuyó significativamente en el grupo de cobayos con modelo de asma ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ ; Figura 18A). Por otro lado, talina también mostró dos bandas, de 270 y 250 kDa y la intensidad relativa fue similar entre los grupos ( $n = 4$ ; Figura 18B). Finalmente,  $\alpha$ -actina con un peso de 40 kDa, no mostró cambios en su expresión en cobayos del modelo de asma en comparación con los controles ( $n = 3$ ; Figura 18C).

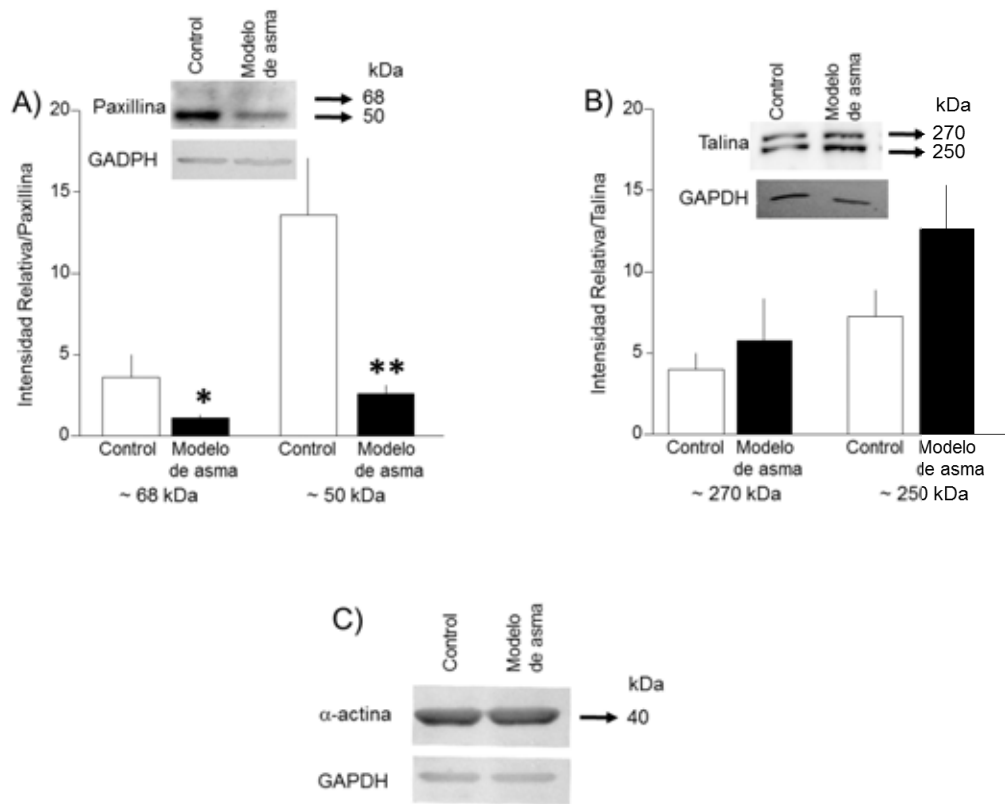


Figura 18. Expresión de paxilina, talina y  $\alpha$ -actina en miocitos traqueales en un modelo de asma. Intensidad relativa obtenida de western blot de A) paxilina (bandas de 68 y 50 kDa) y B) talina (bandas de 270 y 250 kDa). Los western blots de paxilina y talina son representativos de cuatro cobayos con modelo de asma y cuatro controles. En C) se muestran los resultados para  $\alpha$ -actina y el western blot es representativo de tres cobayos controles y tres cobayos con modelo de asma. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar en modelo de asma (barras negras) y controles (barras blancas). \*\* $P < 0.001$  y \* $P < 0.05$  comparado con su grupo control (prueba t de Student no pareada).

## 9. Expresión de ILK en miocitos traqueales en un modelo de asma.

La técnica de western blot empleando un anticuerpo específico dirigido contra ILK mostró una banda de 50 kDa (Figura 19A). La intensidad relativa de esta banda fue significativamente más alta en el grupo de cobayos controles con respecto a los cobayos con modelo de asma ( $P < 0.001$ ;  $n = 6$ ; Figura 19A). La disminución de ILK también se observó a nivel gene ( $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ; Figura 18B). Como se observa en la Figura 19C y 19D, los niveles proteicos de ILK tuvieron una relación inversa con la broncoobstrucción y el grado de hiperreactividad ( $P < 0.01$ ,  $n = 10$ ).

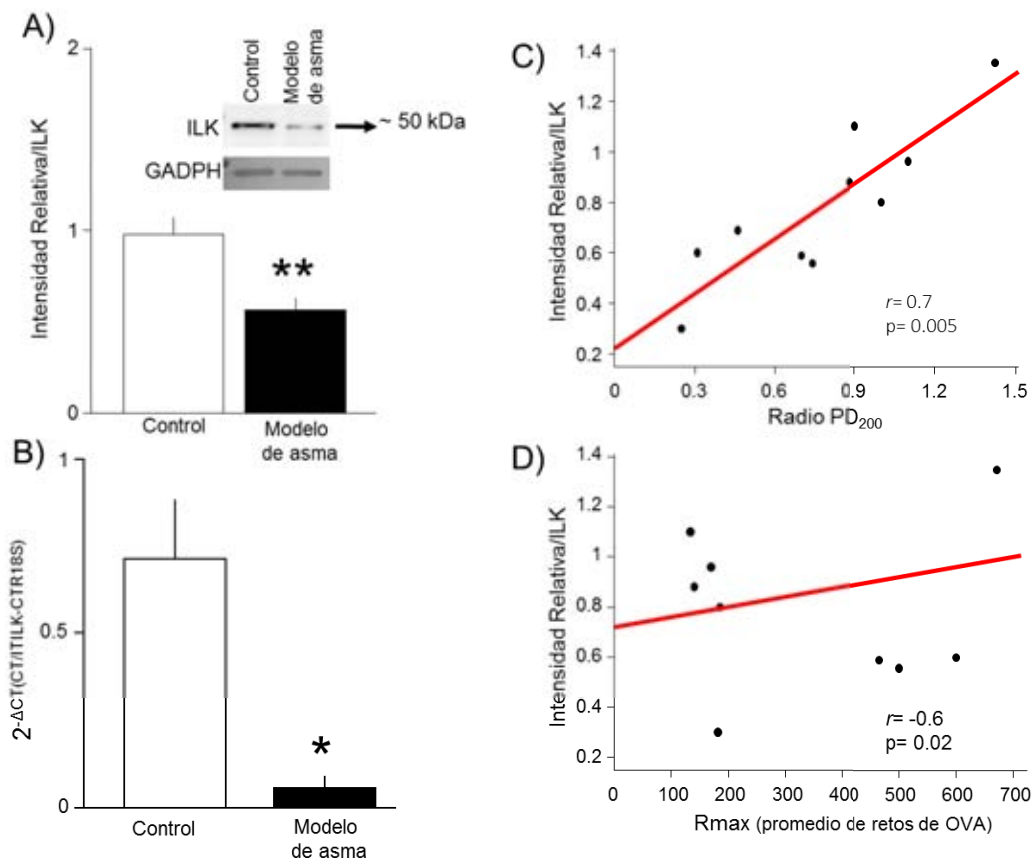


Figura 19. Expresión de ILK en miocitos traqueales en cobayos con modelo de asma. A) Intensidad relativa de la banda de ILK de 50 kDa observada mediante western blot en cobayos controles y con modelo de asma ( $n = 6$ ). B) RT-PCR del gene ILK. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar en cobayos con modelo de asma (barras negras) y controles (barras blancas) ( $n = 5$ ). \*\* $P < 0.001$  y \* $P < 0.05$  comparado con su respectivo grupo control (prueba t de Student no pareada). C) Gráfico de dispersión mostrando la intensidad relativa de ILK correlacionada con el grado de hiperreactividad de las vías aéreas (cociente  $DP_{200}$ ) ( $n = 10$ ) y D) se muestra una correlación inversa con el grado de  $R_{max}$  (promedio de retos de OVA) ( $n = 10$ ).  $r$  = coeficiente de correlación de Spearman.

10. Expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo Thr696 en miocitos traqueales en un modelo de asma.

La expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo Thr696 fue evaluada mediante western blot. El western blot mostró un polipéptido con peso molecular de 130 kDa que incrementa su expresión en el grupo de cobayos del modelo de asma comparado con el grupo control ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ , Figura 20).

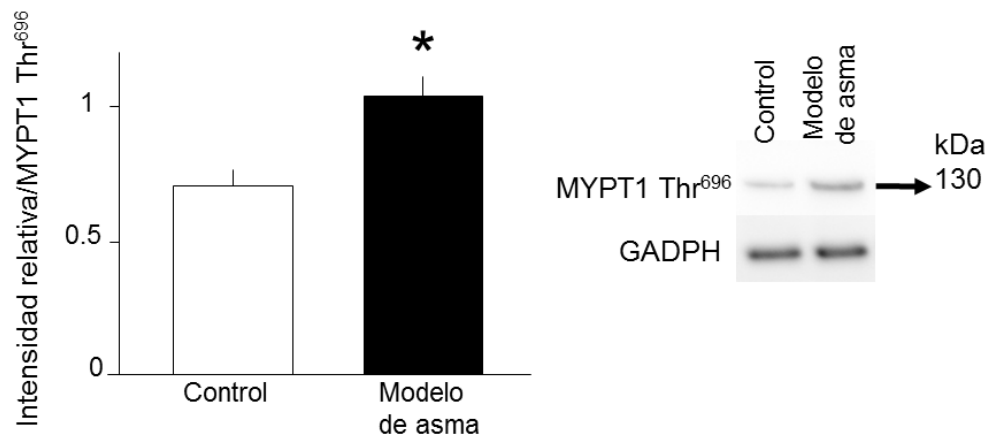


Figura 20. Expresión de MYPT1 fosforilada en el residuo Thr696 en miocitos traqueales de cobayos con modelo de asma. Western blot representativo de seis cobayos para cada grupo. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar. \* $P < 0.05$  comparado con su grupo control (prueba t de Student no pareada).



## DISCUSIÓN

---

El cobayo ha sido un modelo animal útil en el estudio del asma, ya que presenta algunas ventajas con respecto a otros modelos animales como la rata o el ratón. El cobayo comparte varias características farmacológicas que se observan en un individuo humano con asma, además de la fuerte respuesta obstructiva de las vías aéreas después de la estimulación con agonistas (Canning B. and Chou Y., 2008). La respuesta fisiológica al reto antigénico en cobayo con modelo de asma está caracterizada por una obstrucción de las vías aéreas rápida y transitoria en animales sensibilizados (Bazán-Perkins B. et al., 2009; Ramos-Ramírez P. et al., 2013). En este estudio, el reto con solución salina no modificó el índice de broncoobstrucción basal en el grupo control, pero el reto con OVA provocó un incremento transitorio en el mismo índice que alcanzó significancia estadística en comparación con el grupo control. Otra característica importante del asma es el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas, que se refiere a la capacidad de las vías aéreas de acercarse de una forma exagerada a un estímulo que no resulta comparable al grado de acercamiento en individuos sanos (Lauzon A. and Martin J., 2016). En este estudio, la hiperreactividad de las vías aéreas fue evaluada mediante curvas de respuesta a la histamina, mostrando que los cobayos sensibilizados con el antígeno presentan hiperreactividad a la histamina.

Se ha propuesto que el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas tiene un componente persistente, el cual se ha relacionado a cambios estructurales de las vías aéreas que en conjunto se ha llamado remodelación estructural de las vías aéreas. Los mecanismos no se conocen del todo, pero el calibre reducido de las vías aéreas, el incremento en el grosor de la pared de las vías aéreas, el incremento en la masa del músculo liso de las vías aéreas y la contractilidad pueden estar participando (Cockcroft D. and Davis B., 2006). En este estudio, encontramos un incremento significativo de células caliciformes en epitelio bronquial de cobayos del modelo de asma en

comparación con los cobayos controles, lo que sugiere que este modelo de asma aguda induce cambios estructurales en el epitelio de las vías aéreas. Para evaluar la remodelación de las vías aéreas en los cobayos, se tiñeron cortes pulmonares con Tricrómica de Masson para distinguir las capas de músculo liso pulmonar basadas en la tinción del citoplasma en color rojo intenso. A pesar que no se observaron cambios en la masa del músculo liso ni en lámina propia de bronquios ni bronquiolos, se detectó ensanchamiento de los vasos sanguíneos pulmonares de las vías aéreas adyacentes fue observado. También observamos una disminución evidente de la expresión de Caspasa 3 en músculo liso pulmonar de vasos sanguíneos en los cobayos de modelo de asma, lo que sugiere que la apoptosis es inhibida en músculo liso vascular. Estos resultados sugieren que el músculo liso pulmonar de vasos sanguíneos, pero no el músculo liso de las vías aéreas, es capaz de generar cambios de remodelación estructural en el modelo de asma aguda en cobayos.

En comparación con otras células, el músculo liso de las vías aéreas expresa mayor cantidad de Caveolina-1 en la membrana plasmática (Gabella G., 1976). En músculo liso de las vías aéreas, la plataforma de señalización asociada a Caveolina-1 tiene un papel fundamental en el reclutamiento de varias proteínas de señalización que están involucradas en la contracción muscular (Darby P. et al., 2000). En este estudio, los experimentos de citometría de flujo demostraron que el número de células que expresaron Caveolina-1 incrementó significativamente en los cobayos del modelo de asma comparados con los cobayos controles. En las bandas del músculo liso de vías aéreas de animales experimentales se han observado resultados similares por medio de inmunohistoquímica (Gosens R. et al., 2011). Por otro lado, en nuestro estudio se observaron por inmunoelectroforesis dos bandas específicas para Caveolina-1 de aproximadamente de 18 y 20 kDa respectivamente, las cuales podrían ser las dos isoformas que se han descrito en la literatura, la isoforma  $\alpha$  (de migración lenta) que corresponde a la de 20 kDa y la isoforma  $\beta$  (de migración rápida) que corresponde a la de 18 kDa (Cohen A. et al., 2004). En nuestro análisis de densitometría, la

isoforma  $\alpha$  tiende a incrementar en los cobayos del modelo de asma, aunque, la isoforma  $\beta$  es similar en ambos grupos. Se ha reportado que la expresión de estas dos isoformas es diferencial en distintos tipos celulares y en determinados estadios de la vida de un organismo. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario en ratones, ambas isoformas pueden ser detectadas en el pulmón a las 12.5 semanas, pero después del nacimiento la isoforma  $\alpha$  sólo se detecta hasta pasados dos meses de vida en vasos sanguíneos y en células alveolares tipo I (Maniatis N. et al., 2012). Además, se ha observado que ambas isoformas presentan la capacidad de fosforilarse en residuos de serina *in vitro*, pero sólo la isoforma  $\beta$  lo hace *in vivo*. Esto sugiere, que las isoformas correspondientes a Caveolina-1 podrían tener funciones biológicas distintas y por tanto una expresión diferencial en los tejidos (Gupta R. et al., 2014). En este estudio también observamos cambios funcionales en los cobayos del modelo de asma que correlacionaron con el número de células de músculo liso que expresaron Caveolina-1. Esto sugiere que a mayor número de células que expresan Caveolina-1 hay mayor hiperreactividad de las vías aéreas de los cobayos del modelo de asma. Además, la obstrucción de las vías aéreas inducida por antígeno está asociada directamente con las células del músculo de las vías aéreas que expresan Caveolina-1. Cabe recordar que las plataformas de señalización que se encuentran en la membrana plasmática de las células del músculo liso de las vías aéreas contienen Caveolina-1 entre otras proteínas como las integrinas.

Las integrinas son sensores clave de los componentes de la matriz extracelular y se encuentran alojadas en las adhesiones focales (Hynes R., 2002). Aunque se sabe que los componentes de la matriz extracelular se modifican en el asma, poco se sabe sobre el papel de las integrinas. Previamente, usando el mismo modelo de asma que en este estudio observamos que la acumulación del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrinas en fibras de colágeno y en las bandas de músculo liso se asociaron con el grado de fibrosis de las vías aéreas, inflamación e hiperreactividad (Bazán-Perkins B. et al., 2009). En este estudio empleamos microscopía electrónica

de transmisión para evaluar la expresión de ambos dominios de  $\beta 1$  integrinas. Confirmamos que el dominio citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina está localizado sobre fibras de colágena que no contienen restos celulares en la zona. La subunidad  $\beta 1$  de integrina no es capaz de interactuar con componentes de la matriz extracelular, por tanto, la unión de  $\beta 1$  integrina a la colágena puede ocurrir a través del dominio I que se encuentra en la subunidad  $\alpha$  de las integrinas (Popova et al., 2007). Algunas  $\beta 1$  integrinas como  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  y  $\alpha 11\beta 1$  son receptores de colágena. De acuerdo con lo mencionado, la subunidad  $\beta 1$  de integrina que se encuentra cercana a las fibras de colágena podría estar asociada con una subunidad  $\alpha$  de integrina. La presencia de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de integrinas en las mismas áreas fue descrita previamente (Bazán-Perkins B. et al., 2009). Las integrinas encontradas en este estudio en áreas de matriz extracelular probablemente sean  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  sin descartar a otras posibles integrinas. Por otro lado, también encontramos que los niveles de los dominios extracelular y citosólico de la subunidad  $\beta 1$  de integrina en las células del músculo liso de las vías aéreas son iguales en cobayos del modelo de asma y de controles, lo que sugiere que el músculo liso de las vías aéreas no sea el tejido que esté sobre produciendo ni escindiendo a la subunidad  $\beta 1$  integrina.

La subunidad  $\beta 1$  de integrina en humano y cobayo es un polipéptido de 88 kDa con aproximadamente 92.6 % grado de homología a nivel de secuencia de aminoácidos (BLAST at Swiss Institute of Bioinformatics), sugiriendo una cercana similitud bioquímica entre especies. Las modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación y fosforilación podrían inducir cambios en el peso molecular de los polipéptidos. La subunidad  $\beta 1$  de integrina tiene 12 sitios de glicosilación y 5 posibles sitios de fosforilación (Zheng M. et al., 1994; Mulrooney J. et al., 2001). En humano, la glicosilación parcial en el retículo endoplásmico y en aparato de Golgi genera un polipéptido inmaduro de 105-110 kDa que no se encuentra en la membrana plasmática. La forma madura funcional de  $\beta 1$  integrina en la superficie celular es aproximadamente de 125-130 kDa (Argaves W.

et al., 1987; She S. et al., 2010). En nuestro estudio, encontramos que los anticuerpos que reconocen al dominio citosólico y al extracelular reconocieron polipéptidos de 100 y 130 kDa en músculo liso, lo que sugiere que algunos de estos polipéptidos corresponden a la subunidad de integrina madura e inmadura. Sorprendentemente, los dos polipéptidos (100 y 130 kDa) también fueron detectados en tejido conectivo, donde el componente más abundante es la colágena (Gelse et al., 2003). Hasta el momento, se desconoce si los dominios citoplásmicos de las integrinas se encuentran de manera extracelular. Sin embargo, hay evidencia documentada de integrinas solubles empleando anticuerpos que reconocen el dominio extracelular. En sitios inflamatorios, el flujo de macrófagos en ratón es promovido por el corte de  $\beta 2$  integrinas por metaloproteasas, un proceso que limita la inflamación local (Gómez I. et al., 2012). Además, la subunidad  $\alpha 1$  de integrina se ha encontrado en plasma de humano (Bank I. et al., 1999). Por otro lado, se ha observado que la secreción de receptores es un fenómeno común, por ejemplo, el receptor de insulina soluble fue encontrado en plasma como una proteína funcional (Papa V. et al., 1993). Por todo esto, es probable que las integrinas pudieran ser producidas como proteínas solubles, al menos en cobayo.

Un papel principal de la fragmentación del dominio extracelular de receptores de membrana en células estimuladas y no estimuladas es la modulación de la función del receptor y el recambio de la proteína (Arribas J. and Borroto A., 2002). Además, en cáncer de colon, el corte de la subunidad  $\beta 1$  de integrinas induce otros efectos como la disminución de la adhesión celular e incrementa la motilidad (Kryczka J. et al., 2012). De hecho, los fragmentos solubles de  $\beta 1$  integrinas pueden alterar la interacción celular con componentes de la matriz extracelular, luego estos fragmentos en miocitos inducen el anclaje a colágena pero no a fibronectina o laminina (Goldsmith E. et al., 2003). Es posible que los fragmentos solubles de  $\beta 1$  integrinas tengan funciones similares que las descritas con los fragmentos de integrinas cortados actuando como ligandos solubles en las vías aéreas.

La inmunoelectroforesis detectó un incremento en el dominio extracelular de  $\beta 1$  integrina sólo en tejido conectivo en el grupo control. Dos mecanismos que podrían inducir este incremento es el corte de la proteína o un empalme alternativo del mRNA. Para evaluar la segunda posibilidad, el mRNA de *ITGB1* (gen de  $\beta 1$  integrina) se evaluó en miocitos. La expresión del *ITGB1* incrementó en el grupo del modelo de asma. El mRNA de *ITGB1* fue sobre producido en el modelo de asma, pero mediante la técnica de RACE-PCR sólo encontramos una banda correspondiente a 2000 pares de bases, lo que indica que posiblemente el mRNA de *ITGB1* no produzca variantes por empalme alternativo. Con todo lo anterior, la integrina podría ser modificada post-traduccionalmente.

En términos generales, la contracción muscular es el resultado de rearrreglos del citoesqueleto asociado a integrinas en el músculo liso. Un efector citoplásmico importante de las integrinas es una molécula llamada ILK, una pseudocinasa involucrada en el rearrreglo de los filamentos de actina, ensamble de adhesiones focales y la conducción de fuerzas a la matriz extracelular (Qian Y. et al., 2005; Eckes B. et al., 2014). Algunos autores han sugerido la importancia de la expresión de ILK en el músculo liso. Por ejemplo, se sabe que ILK es capaz de fosforilar directamente a MYPT1 en Thr<sup>696</sup>. MYPT1 es la subunidad reguladora de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), una proteína principal en la relajación del músculo liso. La fosforilación de sitios específicos en MYPT1 puede inducir a la inhibición o estimulación de la actividad de MYPT1. En particular la fosforilación en Thr<sup>696</sup> de MYPT1 inhibe la actividad de MLCP y promueve la contracción (Feng J. et al., 1999; Velasco G. et al., 2002). Por medio de PCR y por inmunoelectroforesis encontramos que la expresión de ILK en los cobayos del modelo de asma disminuyó con respecto a los controles. Por lo anterior, esperábamos una disminución en la fosforilación de Thr<sup>696</sup> en MYPT1, pero encontramos lo opuesto. Es posible que esto se deba a que la ILK no es la principal cinasa que participa en la fosforilación de esta proteína, se sabe que otras cinasas como ROK fosforilan este sitio. Otros estudios sugieren que ILK tiene otras funciones. Se ha

demostrado que la depleción de ILK en células de músculo liso traqueal de perros mestizos incrementó la expresión de genes de diferenciación (Wu Y. et al., 2008). De manera interesante, se ha mostrado que la disminución de ILK conlleva a un fenotipo hipercontráctil en células de músculo liso vascular (Montanez E. et al., 2009). Los datos mostrados en este estudio, concuerdan con este último hallazgo, ya que el grado de hiperreactividad y broncoobstrucción de las vías aéreas están inversamente relacionadas a los niveles de ILK en el músculo liso de las vías aéreas. Además, el ensamble apropiado de la organización del complejo de la señalización de  $\beta 1$  integrina in vivo está asociado con la expresión de ILK (Zong H. et al., 2009). Por esto, nuestros hallazgos sugieren que la disminución de ILK podría reflejar un ensamble alterado de  $\beta 1$  integrina en el músculo liso de las vías aéreas de cobayos del modelo de asma.

Otras proteínas involucradas en el ensamble de adhesiones focales son Paxilina y Talina. Se ha visto que ambas proteínas están involucradas en funciones diferentes en las adhesiones focales. Por ejemplo, se sabe que la Paxilina es fundamental en el inicio de la polimerización de actina durante la activación contráctil del músculo liso y está asociada al complejo de ILK (ILK/PINCH/ $\alpha$ -parvina) (Zhang W. et al., 2007; Gunst S. and Zhang W., 2008). Talina es necesaria para el mantenimiento de la expresión de  $\beta 1$  integrina, pero no para su activación. Además, la unión de  $\beta 1$  integrina a Talina previene su degradación (Liu J. et al., 2011). En nuestro estudio, observamos una disminución en la expresión de Paxilina que fue similar a la disminución de ILK, lo que sugiere que ambas podrían estar asociadas en músculo liso de cobayo, sin embargo, los niveles de expresión de Talina no fueron modificados en el modelo de asma. Se ha sugerido que hay diferentes tipos de adhesiones focales definidas por su localización subcelular, tamaño y composición (Wozniak M. et al., 2004). También, parece que las adhesiones focales asociadas con Talina no están alteradas en el modelo de asma, pero aquellas donde ILK y Paxilina están involucradas, disminuyen o están

desensambladas. Por todo lo anterior, es posible que las adhesiones focales de miocitos de cobayo del modelo de asma tengan un proceso de remodelación molecular.

Finalmente, en la Figura 21 mostramos un modelo molecular que sintetiza algunos de los resultados expuestos en este estudio.

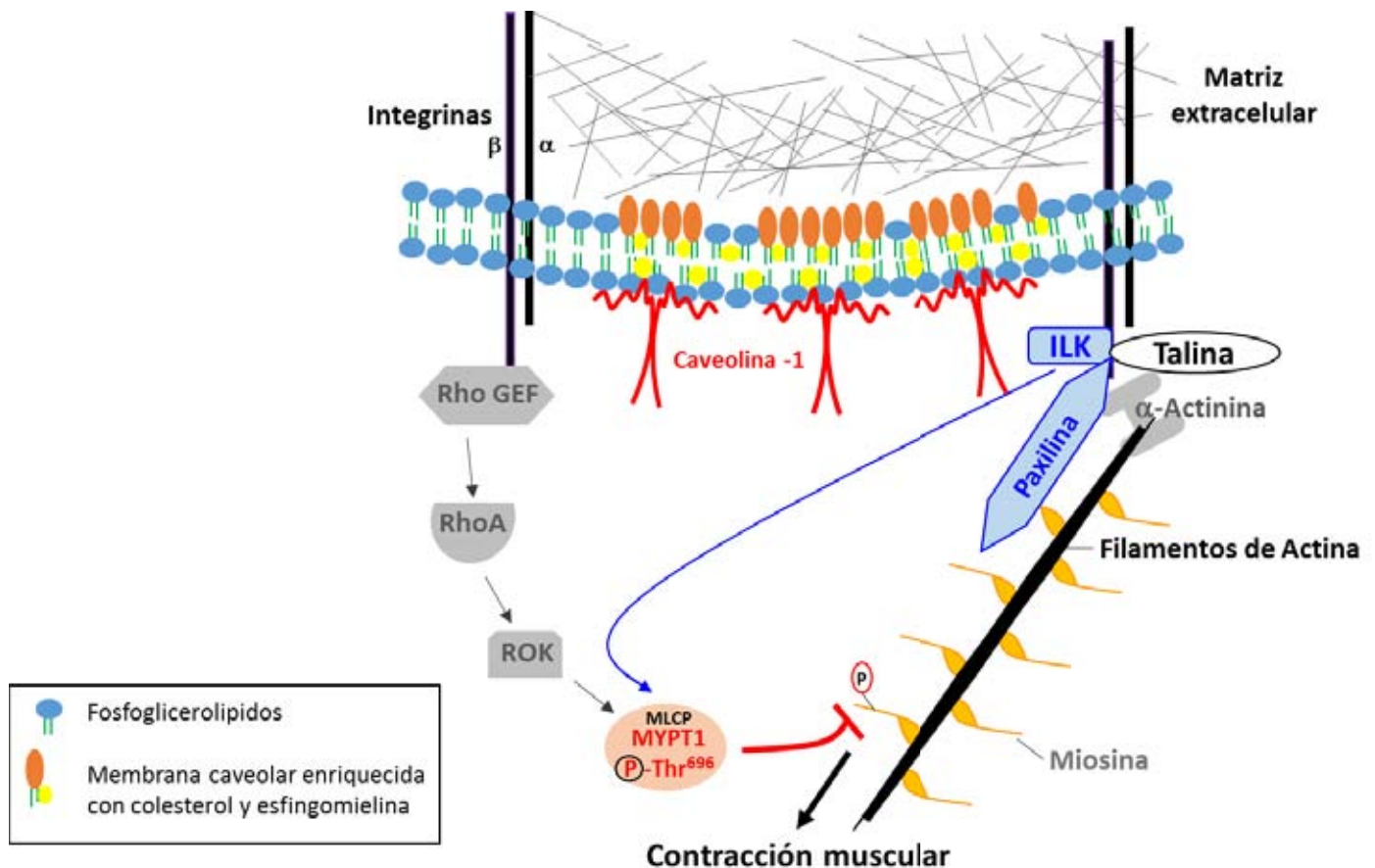


Figura 21. Modelo de remodelación molecular de las adhesiones focales y el desarrollo de la contracción muscular. El incremento en la expresión de Cav-1 en miocitos, podría favorecer el reclutamiento de proteínas de señalización involucradas en la contracción. Por otro lado, la subunidad  $\beta$ 1 de integrinas recluta moléculas pertenecientes a las adhesiones focales que podrían estar participando en el desarrollo de un fenotipo hipercontráctil, tales como ILK, Paxilina y MLCP (Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina). Finalmente, la fosforilación en Thr<sup>696</sup> de la subunidad catalítica de MLCP, MYPT1Thr<sup>696</sup>, evita la desfosforilación de la Miosina, manteniendo así la contracción del músculo liso de las vías aéreas. Se muestran las proteínas que incrementan (rojo), las que disminuyen (azul) y las que no se modifica (negro) su expresión en las adhesiones focales de miocitos del modelo de asma. Las proteínas mostradas en gris no fueron evaluadas en este estudio.



## CONCLUSIÓN

---

Nuestros datos sugieren que el modelo de asma en cobayo parece inducir un fenotipo contráctil en el músculo liso de las vías aéreas y un fenotipo proliferativo del músculo liso en vasos pulmonares. Además,  $\beta 1$  integrina es secretada en la pared de las vías aéreas de cobayos, y estas proteínas son capaces de anclarse a la colágena. Es posible que  $\beta 1$  integrina no esté debidamente ensamblada en las adhesiones focales que contienen ILK y Paxilina en el músculo liso de las vías aéreas en el modelo de asma. Además, ILK no está involucrada en el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas. Es posible que los fragmentos de  $\beta 1$  integrina sean cortados de otras células y no del músculo liso de las vías aéreas de cobayo. Un mecanismo importante que podría contribuir a la hiperreactividad de las vías aéreas en el modelo de asma es la regulación positiva de la fosforilación de MYPT1Thr<sup>696</sup> y la remodelación molecular de las adhesiones focales.

## PERSPECTIVAS

---

1. Mediante secuenciación, determinar las posibles modificaciones que tienen los dominios citosólico y extracelular de la subunidad  $\beta 1$  de integrina.
2. Evaluar qué tipos celulares son los que están liberando los fragmentos de la subunidad  $\beta 1$  de integrina y depositándolos en la pared de las vías aéreas.
3. Determinar qué cinasa puede estar regulando la actividad de MYPT1 fosforilada en Thr<sup>696</sup> para desarrollar el fenotipo hipercontráctil del músculo liso de las vías aéreas.
4. Profundizar más en el estudio de la remodelación molecular de las adhesiones focales en el modelo de asma y su relación con el desarrollo de la contracción del músculo liso de las vías aéreas.

## LITERATURA CITADA

---

Abraham W.M., Ahmed A., Serebriakov I., Carmillo A.N., Ferrant J., de Fougerolles A.R., Garber E.A., Gotwals P.J., Koteliensky V.E., Taylor F. and Lobb R.R. (2004). A monoclonal antibody to alpha1beta1 blocks antigen-induced airway responses in sheep. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(1), 97-104.

Alessi D., MacDougall L.K., Sola M.M., Ikebe M. and Cohen P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, 210(3), 1023-1035.

Amano M., Ito M., Kimura K., Futaka Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y. and Kaibuchi K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho kinase). *J Biol Chem*, 271, 20246-20249.

An S., Bai T., Bates J., Black J., Brown R., Brusasco V., Chitano P., Deng L., Dowell M., Eidelman D., Fabry B., Fairbank N., Ford L., Fredberg J., Gerthoffer W., Gilbert S., Gosens R., Gunst S., Halayko A., Ingram R., Irvin C., James A., Janssen L., King G., Knight D., Lauzon A., Lakser O., Ludwig M., Lutchen K., Maksym G., Martin J., Mauad T., McParland B., Mijailovich S., Mitchell H., Mitchell R., Mitzner W., Murphy T., Paré P., Pellegrino R., Sanderson M., Schellenberg R., Seow C., Silveira P., Smith P., Solway J., Stephens N., Sterk P., Stewart A., Tang D., Tepper R., Tran T. and Wang L. (2007). Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J*, 29(5), 834-860.

Argaves W.S., Suzuki S., Arai H., Thompson K., Pierschbacher M.D. and Ruoslahti E. (1987). Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol*, 105, 1183-1190.

Arribas J. and Borroto A. (2002). Protein ectodomain shedding. *Chem Rev*, 102, 4627-4638.

Attwell S., Mills J., Troussard A., Wu C. and Dedhar S. (2003). Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell*, 14(12), 4813-4825.

Bank I., Weiss P., Doolman R., Book M. and Sela B.A. (1999). Detection of soluble alpha1 integrin in human serum. *J Lab Clin Med*, 134, 599-604.

Barczyk M., Carracedo S. and Gullberg D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*, 339(1), 269-280.

Bazán-Perkins B., Sánchez-Guerrero E., Vargas M. H., Martínez-Cordero E., Ramos-Ramírez P., Alvarez-Santos M. (2009). Beta1-integrins shedding in a guinea pig model in chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy*, 39, 740-751.

Bergner A. and Sanderson M. (2002). ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(6), L1271-1279.

Boudrez A., Evens K., Beullens M., Waelkens E., Stalmans W. and Bollen M. (1999) Identification of MYPT1 and NIPPI as subunits of protein phosphatase 1 in rat liver cytosol. *FEBS Lett*, 455, 175-178.

- Burgel P.R., Blic J., Chanez P., Delacourt C., Devillier P., Didier A., Dubus J.C., Frachon I., Garcia G., Humbert M., Laurent F., Louis R., Magnan A., Mahut B., Perez T., Roche N., Tillie-Leblond I., Tunon de Lara M. and Dusser D. (2009). Update on the roles of distal airways in asthma. *European Respiratory Review*, 18, 80-95.
- Calderwood D.A., Shattil S.J., Ginsberg M.H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275(30), 22607-22610.
- Canning B.J. and Chou Y. (2008). Using guinea pig in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther*, 21, 702-720.
- Chiba Y., Takada Y., Miyamoto S., Mitsui-Saito M., Karaki H. and Misawa M. (1999). Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated  $Ca^{2+}$ -sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 127, 597-600.
- Chiba Y., Sakai H. and Misawa M. (2005). Endothelin-1-induced translocation of RhoA is mediated by endothelin ET(A) receptors in rat bronchial smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 517(3), 182-185.
- Chiba Y., Matsusue K. and Misawa M. (2010). RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Journal of Pharmacological Sciences*, 114, 239-247.
- Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W. and Lisanti M.P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Phys Rev*, 84(4), 1341-1379.
- Critchley D.R. (2000). Focal adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12: 133-139.
- Cockcroft D.W. and Davis B.E. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(3), 551-559.
- de Weerd W.F. and Leeb-Lundberg L.M. (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 272 (28), 17858-17866.
- Dai J., Kuo K., Leo J., Paré P., van Breemen C. and Lee C. (2007). Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36(5), 600-608.
- Darby P.J., Kwan C.Y. and Daniel E.E. (2000). Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in  $Ca^{2+}$  handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1226-L1235.
- David A. and Wagner G. (2012). Aparato Respiratorio. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. E-libro Corporation.
- Dedhar S. (2000). Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2), 250-256.
- Dippold R.P. and Fisher S.A. (2014). Myosin phosphatase isoforms as determinants of smooth muscle contractile function and calcium sensitivity of force production. *Microcirculation*, 21(3): 239-248.

Dirksen W.P., Vladoic F. and Fisher S.A. (2000). A myosin phosphatase targeting subunit isoform transition defines a smooth muscle developmental phenotypic switch. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278:C589–C600.

Doering D. and Solway J. (2013). Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *Journal Appl Physiol*, 114(7), 834-843.

Eckes B., Krieg T. and Wickstrom S.A. (2014). Role of integrin signalling through integrin-linked kinase in skin physiology and pathology. *Exp Dermatol*, 23, 453–456.

Feng J., Ito M., Ichikawa K., Isaka N., Nishikawa M., Hartshorne D.J. and Nakano T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 37385-37390.

Fujimoto T., Nakade S., Miyawaki A., Mikoshiba K. and Ogawa K. (1992). Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol*, 119 (6), 1507-1513.

Gabella G. (1976). Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea pigs taeni coli. *Cell Tissue Res*. 170, 161-186.

Gallegos L., Mei R.N. and Brugge J.S. (2011) The myosin-II-responsive focal adhesión proteome: a tour de force? *Nature Cell Biology* 13(4): 344-347.

García-Sancho C., Fernández-Plata R., Martínez-Briseño D., Franco-Marina F., Pérez-Padilla J.R. (2012). Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la Ciudad de México: estudio de base poblacional. *Salud Publica Mex*, 54, 425-432.

Geiger B., Spatz J.P. and Bershadsky A.D. (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 21-33.

Global Initiative for Asthma (GINA) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2015. Cita disponible en: <http://www.ginasthma.org>

Goldsmith E.C., Carver W., McFadden A., Goldsmith J.G., Price R.L., Sussman M., Lorell B.H., Cooper G. and Borg T.K. (2003). Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H2227–H2234.

Gomez I.G., Tang J., Wilson C.L., Yan W., Heinecke J.W., Harlan J.M. and Raines E.W. (2012). Metalloproteinase-mediated shedding of Integrin beta2 promotes macrophage efflux from inflammatory sites. *J Biol Chem*, 287, 4581–4589.

Gosens R., Mutawe M., Martin S., Basu S., Bos S.T., Tran T. and Halayko A.J. (2008). Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med*, 8(8), 741-753.

Gosens R., Stelmak G.L., Bos S.T., Dueck G., Mutawe M.M. and Schaafsma D. (2011). Caveolin- 1 is required for contractile phenotype expression by airway smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*, 15, 2430-2442.

Gunst S. and Tang D. (2000). The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J*, 15(3), 600-616.

Gunst S.J. and Zhang W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: A new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C576–C587.

Gupta R., Toufaily C. and Annabi B. (2014). Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. *Bioch*, 197, 188-202.

Hakonarson H. and Grunstein M. (1998). Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(5 Pt 3), S115-122.

Hamelmann E. S., Takeda K., Oshiba A., Larsen G., Irvin C. and Gelfand E. (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, 766-775.

Hannigan G.E., Leung-Hagesteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppolino M.G., Radeva G., Filmus J., Bell J.C. and Dedhar S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 379(6560), 91-96.

Hardin C. and Vallejo J. (2009). Dissecting the functions of protein-protein interactions: caveolin as a promiscuous partner. Focus on “Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRCP1 and IP3R3 to regulate Ca<sup>2+</sup> store release-induced Ca<sup>2+</sup> entry in endothelial cells”. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(3), C387-C389.

Hartshorne D.J., Ito M. and Erdödi F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, 19(4), 325-341.

Hirano K., Phan B.C. and Hartshorne D.J. (1997). Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 272, 3683-3688.

Hirota S. and Janssen L. (2007). Sodium and asthma: something borrowed, something new? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(6), L1369-1373.

Holgate S. T. (2010). A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allerg Asthma Immunol Res*, 2(3), 165-171.

Humphries M.J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28(4), 311-339.

Hynes R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673–687.

Ichicawa K., Hirano K., Ito M., Tanaka J., Nakano T. and Hartshorne D.J. (1996). Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochem*, 35: 6313-6320.

Isshiki M., Ando J., Korenaga R., Kogo H., Fujimoto T., Fujita T. and Kamiya A. (1998). Endothelial Ca<sup>2+</sup> waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5009-5014.

Ito M., Nakano T., Erdodi F. and Hartshorne D.H. (2004) Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. *Mol and Cell Biochem*, 259: 197-209.

Janssen L. (2002). Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(6), L1161-1178.

- Johnson D., Cohen P., Chen M.X., Chen Y.H. and Cohen P.T. (1997). Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem*, 244: 931-939.
- Kannan M., Prakash Y., Brenner T., Mickelson J. and Sieck G. (1997). Role of ryanodine receptor channels in Ca<sup>2+</sup> oscillations of porcine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, 272(4), L659-664.
- Khatri J.J., Joyce K.M., Brozovich F.V. and Fisher S.A. (2001). Role of myosin phosphatase isoforms in cGMP mediated smooth muscle relaxation. *J Biol Chem*, 276:37250–37257.
- Kim H.Y., DeKruyff H. and Umetsu T. (2010). The many paths of asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 11(7), 577-584.
- Kim H.R., Appel S., Vetterkind S., Gangopadhyay S.S. and Morgan K.G. (2008). Smooth muscle signaling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med*, 12(6A): 2165-2180.
- Kim H.R., Hoque M. and Hai C.M. (2004) Cholinergic receptor-mediated differential cytoskeletal recruitment of actin- and integrin-binding proteins in intact airway smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C1375-C1383.
- Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A. and Kaibuchi K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273, 245-248.
- Kip S., Smelter M., Iyanoye A., Chini E., Prakash Y., Pabelick C. and Sieck G. (2006). Agonist-induced cyclic ADP ribose production in airway smooth muscle. *Arch Biochem Biophys*, 452(2), 102-107.
- Kiss E., Murányi A., Csontos C., Gergely P., Ito M., Hartshorne D.J. and Erdodi F. (2002). Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the site inhibitory in platelet cytoskeleton. *Biochem J*, 365, 79-87.
- Kovtun O., Tillu V.A., Ariotti N., Parton R.G. and Collins B.M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J Cell Sci*, 128(7), 1269-1278.
- Kryczka J., Stasiak M., Dziki L., Mik M., Dziki A. and Cierniewski C. (2012). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the beta1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *J Biol Chem*, 287, 36556–36566.
- Lauzon A.M. and Martin J.G. (2016) Airway hyperresponsiveness: smooth muscle as the principal actor. *F1000 Res*, 306.
- Liu X. and Farley M. (1996). Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(1), 178-186.
- Liu J., He X., Qi Y., Tian X., Monkley S.J., Critchley D.R., Corbett S.A., Lowry S.F., Graham A.M. and Li S. (2011). Talin1 regulates integrin turnover to promote embryonic epithelial morphogenesis. *Mol Cell Biol*, 31, 3366–3377.
- Lloyd C. and Hessel M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than Th2 cells. *Nat Rev Immunol*, 10, 838-848.

MacDonald J.A., Borman M.A., Murányi A., Somlyo A.V., Hartshorne D.J. and Haystead T.A. (2001). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2419-2424.

Maniatis N.A., Chemaya O., Shinin V., and Minshall R.D. (2012). Caveolins and lung function. *Adv Exp Med and Biol*, 729, 157-179.

Matsumura F. and Hartshorne D.J. (2008) Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Bioch Biophys Res Commun*, 369(1): 149-156.

Montanez E., Wickstrom S.A., Altstatter J., Chu H. and Fassler R. (2009). Alpha parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling. *EMBO J*, 28, 3132–3144.

Moore C., Meyers D., Wenzel S., Teague G., Li H., Li X., D'Agostino R., Castro M., Curran-Everett D., Fitzpatrick A., Gaston B., Jarjour N., Sorkness R., Calhoun W., Chung K., Comhair S., Dweik R., Israel E., Peters S., Busse W., Erzurum S. and Bleeker E. (2010). Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *ATS Journals*, 181(4), 315-323.

Moore E.D., Etter E.F., Philipson K.D., Carrington W.A., Fogarty K.E., Lifshitz L.M. and Fay F.S. (1993). Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature*, 365(6447), 657-660.

Mulrooney J.P., Hong T. and Grabel L.B. (2001). Serine 785 phosphorylation of the beta1 cytoplasmic domain modulates beta1A-integrin-dependent functions. *J Cell Sci*, 114, 2525–2533.

Murányi A., MacDonald J.A., Deng J.T., Wilson D.P., Haystead T.A., Walsh M.P., Erdodi F., Kiss E., Wu Y. and Hartshorne D.J. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J*, 366(Pt 1), 211-216.

Murray R., Fleischmann B. and Kotlikoff M. (1993). Receptor-activated Ca influx in human airway smooth muscle: use of Ca imaging and perforated patch-clamp techniques. *Am J Physiol*, 264(2), C485-490.

Nguyen T.T., Ward J.P. and Hirst S.J. (2005). beta1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(3), 217-223.

Niiri N. and Ikebe M. (2001). Zipper-interacting protein kinase induces Ca<sup>2+</sup>- free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 276, 29567-29574.

Okubo S., Ito M., Takashiba Y., Ichikawa K., Miyahara M., Shimizu H., Konishi T., Shima H., Nagao M., Hartshorne D.J. and Nakano T. (1994) A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Bioch Biophys Res Commun*, 200: 429-434.

Opazo S.A., Zhang W., Wu Y., Turner C.E., Tang D.D. and Gunst S.J. (2004) Tension development during contractile stimulation of smooth muscle requires recruitment of paxillin and vinculin to the membrane. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: C433-C447.

Organización Mundial de la Salud (OMS) Cita disponible en: [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/)



- Papa V., Russo P., Gliozzo B., Goldfinel D., Vigneri R. and Pezzino V. (1993). An intact and functional soluble form of the insulin receptor is secreted by cultured cells. *Endocrinology*, 133, 1369–1376.
- Peng Q., Lai D., Nguyen T.T., Chan V., Matsuda T. and Hirst S.J. (2005). Multiple beta 1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen. *J Immunol*, 174(4), 2258-2264.
- Parekh A. (2006). On the activation mechanism of store-operated calcium channels. *Pflügers Arch*, 453(3), 303-311.
- Parekh A. and Putney J. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85(2), 757-810.
- Parton R. and del Pozo M. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 98-112.
- Pasqualini R., Koivunen E. and Ruoslahti E. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol*, 130(5), 1189-1196.
- Pelaia G., Renda T., Gallelli L., Vatrella A., Busceti M., Agati S., Caputi M., Cazzola M., Maselli R. and Marsico S. (2008). Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory Medicine*, 102(8), 1173-1181.
- Pelaia G., Gallelli L., Vatrella A., Grembiale R., Maselli R., De Sarro G. and Marsico S. (2002). Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Life Science*, 70(9), 977-990.
- Petit V. and Thiery J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell*, 92(7), 477-494.
- Perez J. and Sanderson M. (2005). The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACh, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J Gen Physiol*, 125(6), 535-553.
- Popova S.N., Lundgren-Akerlund E., Wiig H. and Gullberg D. (2007). Physiology and pathology of collagen receptors. *Acta Physiol (Oxf)*, 190, 179–187.
- Prakash Y. (2013). Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305(12), L912-933.
- Pytela R., Pierschbacher M.D. and Ruoslahti E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*, 40(1), 191-198.
- Qian Y., Zhong X., Flynn D.C., Zheng J.Z., Qiao M., Wu C., Dedhar S., Shi X. and Jiang B.H. (2005). ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene*, 24, 3154–3165.
- Ramachandran C., Patil R.V., Combrink K., Sharif N.A. and Srinivas. (2011). Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol Vision*, 17, 1877-1890.

- Ramos-Ramírez P., Campos M.G., Martínez-Cordero E., Bazán-Perkins B. and García-Zepeda E. (2013). Antigen induced airway hiperresponsiveness in absence of bronco-obstruction in sensitized guinea-pigs. *Exp Lung Resp*, 39, 136-145.
- Rodger I.W. (1985). Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. *Br J Clin Pharmacol*, 20(2), 255S-266S.
- Salanueva I.J., Cerezo A., Guadamillas M.C. and del Pozo M.A. (2007). Integrin regulation of caveolin function. *J Cell Mol Med*, 11(5), 969-980.
- Sathish V., Abcejo A.J., VanOosten S.K., Thompson M.A., Prakash Y.S. and Pabelick C.M. (2011). Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 301(4), L607-L614.
- Schaafsma D., Gosens R., Zaagsma J., Halayko A. and Meurs H. (2008). Rho kinase inhibitors: a novel therapeutical intervention in asthma? *Eur J Pharmacol*, 585(2-3), 398-406.
- Schaafsma D., T Bos S., Zuidhof A., Zaagsma J. and Meurs H. (2006). Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *BioMed Central*, 7, 121.
- Schaafsma D., Gosens R., T Bos S., Meurs H., Zaagsma J. and Nelemans S. (2004). Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *British Journal of Pharmacology*, 143, 477-484.
- Sergé A. (2016). The molecular architecture of cell adhesion: dynamic remodeling revealed by videonanoscopy. *Fron Cell and Devel Biol*, 4(36), 1-9.
- She S., Xu B., He M., Lan X. and Wang Q. (2010). Nm23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migration on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. *J Exp Clin Cancer Res*, 29,93.
- Shimizu H., Ito M., Miyahara M., Ichikawa K., Okubo S., Konishi T., Naka M., Tanaka T., Hirano K., Hartshorne D.J. and Nakano T. (1994). Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 269: 30407-30411.
- Shin Y.S., Takeda K. and Gelfand E.W. (2009). Understanding asthma using animal models. *Allergy, asthma & Immunology Research*, 1(1), 10-18.
- Smyth J., Dehaven W., Jones B., Mercer J., Trebak M., Vazquez G. and Putney J. (2006). Emerging perspectives in store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta*, 1763(11), 1147-1160.
- Somlyo A. and Somlyo A. (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83(4), 1325-1358.
- Surks H.K., Mochizuki N., Kasai Y., Georgescu S.P., Tang K.M., Ito M., Lincoln T.M. and Mendelsohn M.E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase  $\beta$ . *Science*, 286, 1583-1587.

- Taggart MJ. (2001). Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci*, 16, 61-65.
- Takada Y., Wayner E.A., Carter W.G. and Hemler M.E. (1988). Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J Cell Biochem*, 37(4), 385-393.
- Takahashi N., Ito M., Tanaka J., Nakano T., Kaibuchi K., Odai H. and Takemura K. (1997). Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21. *Genomics*, 44: 150-152.
- Tanaka J., Ito M., Feng J., Ichikawa K., Hamaguchi T., Nakamura M., Hartshorne D.J. and Nakano T. (1998). Interaction of myosin phosphatase target subunit 1 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. *Biochem*, 37, 16697-16703.
- Thirstrup S. (2000). Control of airway smooth muscle tone. I electrophysiology and contractile mediators. *Respir Med*, 94(4), 328-336.
- Vargas Becerra M.H. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 68(S2), S91-S97.
- Velasco G., Armotrong C., Morrice N., Frame S. and Cohen P. (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1 M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett*, 527, 101-104.
- Vennera M. and Picado C. (2012). Patologías mediadas por la Inmunoglobulina E: de la Inmunoglobulina E al Omalizumab. *Inmunología*, 31(4).
- Wiesner S., Legate K.R. and Fässler R. (2005). Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci*, 62(10), 1081-1099.
- Wiparat M. (2014). Airway remodelling in asthma: role for mechanical forces. *Asia Pacific Allergy*, 4(1), 19-24.
- Welsch U. (2008) *Histología*. España: Editorial Médica Panamericana.
- West, J.B. (2002) *Fisiología respiratoria*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Wozniak M.A., Modzelewska K., Kwong L. and Keely P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 1692, 103–119.
- Wu C. and Dedhar S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol*, 155(4), 505-510.
- Wu Y., Huang Y., Herring B.P. and Gunst S.J. (2008). Integrin-linked kinase regulates smooth muscle differentiation marker gene expression in airway tissue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L988–L997.
- Yamauchi K. and Inoue H. (2007). Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling. *Allergol Int*, 56(4), 321-329.

Ying S., Zhang G., Gu S. and Zhao J. (2006). How much we do know about atopic asthma: we are we know? *Cellular and Molecular Immunology*, 3(5), 321-332.

Zamir E. and Geiger B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114(Pt 20), 3583-3590.

Zhang W.W. and Gunst S.J. (2006) Dynamic association between alpha-actinin and beta-integrin regulates contraction of canine tracheal smooth muscle. *J Physiol*, 572: 659-676.

Zhang W., Wu Y., Wu C. and Gunst S.J. (2007). Integrin-linked kinase regulates N-WASp-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, 282, 34568–34580.

Zheng M., Fang H. and Hakomori S. (1994). Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem*, 269, 12325–12331.

Zong H., Bastie C.C., Xu J., Fassler R., Campbell K.P., Kurlandl J. and Pessin J.E. (2009). Insulin resistance in striated muscle-specific integrin receptor beta1deficient mice. *J Biol Chem*, 284, 4679–4688.

## RESEARCH

## Open Access

# Antigen-induced airway hyperresponsiveness and obstruction is related to caveolin-1 expression in airway smooth muscle in a guinea pig asthma model

Mayra Álvarez-Santos<sup>1</sup>, Patricia Ramos-Ramírez<sup>1</sup>, Fernando Gutiérrez-Aguilar<sup>1</sup>, Sandra Sánchez-Hernández<sup>1</sup>, Ricardo Lascurain<sup>2</sup>, Raúl Olmos-Zuñiga<sup>3</sup>, Rogelio Jasso-Victoria<sup>3</sup>, Norma A Bobadilla<sup>4,5</sup> and Blanca Bazan-Perkins<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Caveolin-1 is a fundamental signalling scaffold protein involved in contraction; however, the role of caveolin-1 in airway responsiveness remains unclear. We evaluated the relationship between caveolin-1 expression in airway smooth muscle (ASM) and antigen-induced airway responsiveness and obstruction in a guinea pig asthma model.

**Methods:** Airway obstruction in sensitised guinea pigs, induced by antigenic (ovalbumin) challenges administered every 10 days, was measured. Antigen-induced responsiveness to histamine and the expression of caveolin-1 and cavin 1, 2 and 3 were evaluated at the third ovalbumin challenge. The control group received saline solution instead of ovalbumin.

**Results:** After the first challenge, antigen exposure induced a transient airway obstruction and airway hyperresponsiveness, high levels of IL-4 and IL-5 in lung and airway goblet cells proliferation at the third antigenic challenge. Caveolin-1 mRNA levels in total lung decreased in the experimental group compared with controls. Flow cytometric analysis of ASM from the experimental group showed a high number of cells expressing caveolin-1 compared with controls. This increase was confirmed by western blot. Airway obstruction and hyperresponsiveness correlated with the degree of increased caveolin-1 expression in ASM cells ( $P < 0.05$ ;  $r = 0.69$  and  $-0.52$ , respectively). The expression of cavin 1, 2 and 3 in ASM also increased in the experimental group compared to controls. Immunohistochemical findings reveal that differences in ASM caveolin-1 were not evident between groups. Nevertheless, a marked decrease in caveolin-1 and caspase 3 was observed in the pulmonary vascular smooth muscle of asthma model compared with controls. Histological analysis did not reveal differences in smooth muscles mass or subepithelial fibrosis levels in airways between groups. However, an enlargement of smooth muscle mass was observed in the pulmonary microvessels of experimental animals. This enlargement did not induce changes in pulmonary or systemic arterial pressures.

**Conclusions:** Our data suggest that caveolin-1 expression in ASM has a crucial role in the development of antigen-induced airway obstruction and hyperresponsiveness in a guinea pig asthma model. In addition, the asthma model in guinea pigs appears to induce a contractile smooth muscle phenotype in the airways and a proliferative smooth muscle phenotype in pulmonary vessels.

**Keywords:** Airway hyperresponsiveness, Airway obstruction, Airway smooth muscle, Asthma, caspase 3, Caveolin-1, Cavin, Pulmonary arterial smooth muscle

\* Correspondence: perkins@iner.gob.mx

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Departamento de Hiperreactividad Bronquial, Calzada de Talpan 4502, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Álvarez-Santos et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Airway smooth muscle is a central structure in asthma pathogenesis. An important characteristic of asthma is that numerous stimuli can trigger intense and rapid bronchospasm in a phenomenon called airway hyperresponsiveness [1,2]. Currently, the precise mechanism by which the development of hyperresponsiveness is induced remains unknown. Nevertheless, airway remodelling features such as fibrosis and smooth muscle hypertrophy/hyperplasia have been recognised as playing a part [2].

Caveolin-1 is a hairpin-loop protein that forms omega-shape invaginations in the plasma membrane, which are known as caveola [3]. In asthma, a shortage of caveolin-1 has been observed in the airways of asthmatic patients [4]. Similar results have been noted in the lungs of ovalbumin-challenged mice, where a reduction of caveolin-1 mRNA expression has been observed [5,6]. In contrast, increased levels of caveolin-1 are found in the airway smooth muscle of antigen-challenged mice [7] and the lungs of guinea pigs subjected to an asthma model [8].

In airways, caveolin-1 is involved in the downregulation of fibrosis and smooth muscle proliferation [9,10]. However, the role of caveolin-1 in airway hyperresponsiveness is unclear. The development of airway hyperresponsiveness in allergen (ovalbumin)-challenged mice without caveolin-1 has been observed [7,11], and Hsia and colleagues [12] have found the absence of caveolin-1 induced airway hyperresponsiveness in endotoxin (lipopolysaccharide)-challenged mice. Moreover, the role of caveolin-1 in airway hyperresponsiveness has become highly controversial due to the view that caveolin-1 is related to the regulation of contractile mechanisms [9,13,14], including, proteins that participate in intracellular  $Ca^{2+}$  mobilisation [15,16]. For example, M3 muscarinic, bradykinin, and H1 histamine receptors and store-operated  $Ca^{2+}$  entry-regulatory mechanisms colocalise with caveolin-1 [17]. Additionally, the recruitment of  $Ca^{2+}$  sensitisation components such as RhoA and PKC $\alpha$  is caveolin-1-dependent [18,19]. Furthermore, caveolin-1 is a key regulator of store-operated  $Ca^{2+}$  entry by increasing Orai1 expression in airway smooth muscle [20].

Since 2005 some proteins named cavins has been associated with caveola biogenesis and organization [21]. In particular, cavin 1 (RNA pol I transcription factor), cavin 2 (serum deprivation protein response) and cavin 3 (SDR-related gene product that binds to C kinase) are widely expressed in tissues, included smooth muscles [22]. Recently, it has been observed a decrease in expression of cavins in airways of caveolin-1 knock-out mice, although its role in airway contraction its unknown [7].

Experimental asthma models are fundamental in asthma research. Particularly, guinea pigs asthma model are susceptible to develop early and late allergic

responses after allergen challenge and also can be used as a model for chronic allergic asthma [23,24]. Asthma model in guinea pig is useful since the lung pharmacology and the response to inflammatory mediators is similar to humans in comparison to rats and mouse [25,26].

In the current study, we determined the relationship between caveolin-1 expression and the pathophysiological characteristics of asthma and found that caveolin-1 expression increases in airway smooth muscle and that this increase is related to antigen-induced obstruction and hyperresponsiveness. In contrast, pulmonary vascular smooth muscle showed low expression of caveolin-1, which was accompanied by smooth muscle cell proliferation.

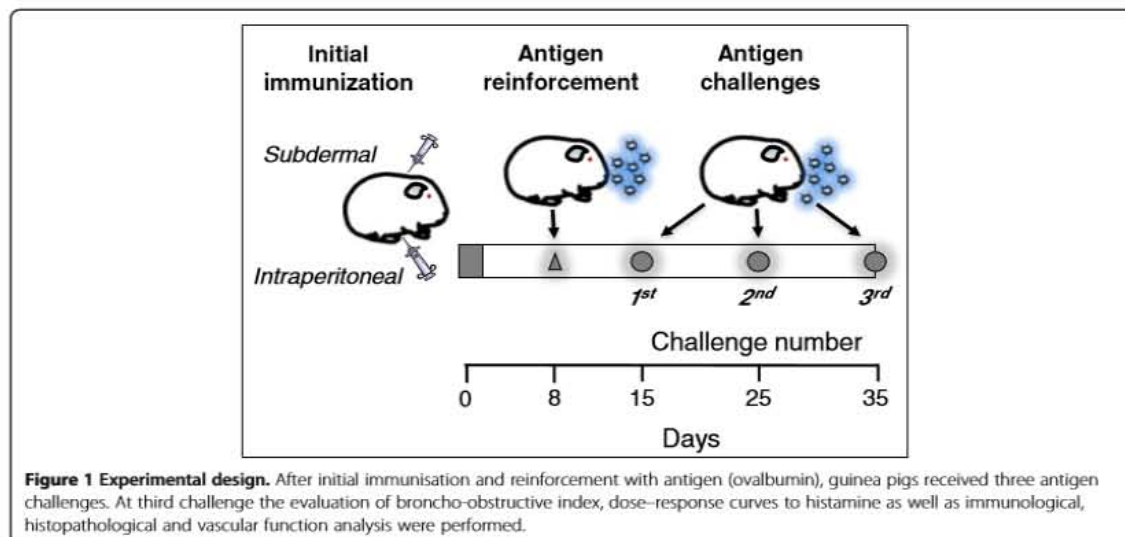
## Methods

We used outbred male guinea pigs weighing 0.35-0.4 kg from Harlan Mexico (strain HsdPoc:DH). The animals were maintained in our institutional laboratory animal facilities with filtered air conditioned at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  and 50-70% humidity, 12/12-h light/dark cycles, sterilised pellets (2040 Harlan Teklad Guinea Pig Diet) and water available *ad libitum*. All animals were handled according to protocols approved by the Scientific and Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

## Study design

To determine the role of caveolin-1 in airway smooth muscle pathophysiology during asthma, ovalbumin sensitised guinea pigs were exposed to three antigenic challenges, each administered every 10 days (Figure 1). During each challenge, the broncho-obstructive index was measured. At the third antigenic challenge, the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness was evaluated by performing dose-response curves to histamine before and after an antigenic challenge. Animals were then sacrificed to obtain lung and tracheal samples. In lung samples, caveolin-1 mRNA was measured by RT-PCR. Additionally, changes in the amount of collagen in the airway lamina propria and the extent of airway and pulmonary microvessel smooth muscle layers were analysed via light microscopy. Caveolin-1 expression was examined using immunohistochemistry. Caveolin-1 expression in smooth muscle cells from tracheae was measured by flow cytometry. Tracheal smooth muscle strips were used to evaluate the expression of caveolin-1 and cavins 1, 2 and 3 by western blot. Systemic and pulmonary arterial pressures were measured at the third challenge. Control animals received sham manoeuvres performed with saline solution.





#### Asthma model

Guinea pigs were sensitised and challenges were performed according to previously described methods [23,27]. The antigen sensitisation of guinea pigs was performed by intraperitoneal (0.5 mg/ml) and subdermal (0.5 mg/ml) injections with a combination of 60 µg/ml ovalbumin plus 1 mg/ml aluminium hydroxide dispersed in saline solution (Figure 1). The doses used in sensitisation and challenges in this asthma model were adjusted to reduce anaphylactic shock during challenges. Antigen sensitisation was reinforced eight days later with ovalbumin aerosol (3 mg/ml saline) delivered over five minutes. Aerosols were produced by a US-1 Bennett nebuliser (flow, 2 ml/min; Multistage liquid impinger, Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Hertfordshire, UK) releasing mixed particles with sizes of <4 µm (44%), 4–10 µm (38%), and >10 µm (18%). From day 15 onward, guinea pigs were challenged over one minute with an ovalbumin aerosol every 10 days (1 mg/ml during the first challenge and 0.5 mg/ml in subsequent challenges) (Figure 1).

Acute airway obstructive responses after ovalbumin inhalation challenges were recorded using a barometric plethysmograph. A whole-body single-chamber plethysmograph for freely moving animals was used (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, USA) to evaluate pulmonary function. The signal from the chamber was processed with computer-installed software (Buxco Bio System XA v1.1) to calculate several respiratory parameters, including the broncho-obstructive index, Penh. We calculated this index using the following equation [28]:

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

where Te = expiratory time (s), Rt = relaxation time (s), PEP = peak expiratory pressure (cmH<sub>2</sub>O), and PIP = peak inspiratory pressure (cmH<sub>2</sub>O). The software was adjusted to include only breaths with a tidal volume of 1 millilitre or more, with minimal inspiratory time of 0.15 seconds, maximal inspiratory time of 3 seconds, and maximal difference between inspiratory and expiratory volumes of 10%. This guinea pig model of allergic asthma does not develop a noticeable late airway response. We corroborated that this sensitisation procedure induces the increment of Th2 (CD4 + IL13+) lymphocytes in bronchoalveolar lavage.

#### Antigen-induced airway responsiveness

In guinea pigs, airway hyperresponsiveness was measured after antigen challenge in sensitised ( $n = 18$ ; asthma model) and non-sensitised ( $n = 13$ ; control group) animals [27]. Airway responsiveness was evaluated on day 35 (third ovalbumin challenge) by exposing each animal to increasing non-cumulative doses of histamine aerosols (0.001 to 0.32 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US) after an initial broncho-obstructive index acquisition before and after ovalbumin administration. Each histamine dose was delivered over 1 minute, and the average of the broncho-obstructive index over the following 10 min was obtained. The interval between doses was 10 min. The dose-response curve finished when the broncho-obstructive index reached three times its baseline level. Once the index returned to the initial baseline value (<50% increment), the ovalbumin challenge was administered. A second curve was measured

three hours later. Control group received saline instead ovalbumin administration.

#### **Dissection of airway smooth muscle strips for flow cytometry and Western blot studies**

Twenty-four hours after concluding histamine curves, some sensitised ( $n = 10$ ) and non-sensitised ( $n = 9$ ) guinea pigs were overdosed with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (65 mg/kg), and their tracheae were dissected to obtain airway smooth muscle strips.

#### **Isolation of airway smooth muscle cells**

The strips of 7 sensitised and 6 non-sensitised guinea pigs were incubated at 37°C for 10 min in 5 ml of Hanks' solution (Gibco, Gaithersburg, MD, US) with 2 mg cysteine and 0.05 U/ml papain (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US). The strips were then washed in Leibovitz's solution (Gibco, Gaithersburg, MD, US) and placed in a physiological saline solution (PSS, mM) containing 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11 glucose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US). Smooth muscle strips were cut (0.5 x 5 mm), and fragments weighing 200 mg total were placed in 2.5 ml PSS with collagenase type I (1 mg/ml; Sigma Chemical Co., US) and dispase II (4 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, US) at 37°C. Ten minutes later, the fragments were transferred to similar PSS containing fresh enzymes. Tissue was dispersed mechanically until isolated cells were observed. Leibovitz's solution was added to stop the enzymatic activity.

#### **Flow cytometry**

For the detection of caveolin-1 production in the isolated airway smooth muscle cells, a three-color immunofluorescence approach was used following a previously described method [29]. Isolated myocytes were incubated with 10 µg/ml brefeldin-A (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, US) for four hours to inhibit new cytokine release. After staining, cells were washed, fixed with 4% p-formaldehyde for 10 min at 4°C, washed, and permeabilised with 0.1% saponin in PBS with 10% BSA and 1% NaN<sub>3</sub>. Afterwards, cells were gently shaken in the dark for 15 min at room temperature and 1 µl/1x10<sup>6</sup> cells were labelled with caveolin-1 antibody (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US). Then, cells were incubated during 30 min with secondary antibody FITC mouse (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, US). Finally, cells were analysed for the expression of markers, on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, US) using software, and 10,000 events were counted. To analyse the staining of intracellular caveolin-1, the blasts were initially gated by their physical properties (forward and side scatter). A second gate was then

drawn based on the fluorescence characteristics of the gated cells, assessing fluorescence intensity by histograms. Intensity of fluorescence staining is expressed as the mean fluorescence intensity. Control stains were performed using fluorochrome-conjugated isotype-matched antibodies. Background staining was <1% and subtracted from experimental values.

#### **Western blot analysis**

Smooth muscle strips from guinea pig tracheae ( $n = 3$ , each group) were placed in lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and EGTA, 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin and leupeptin, 1.0 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 50 mM NaF; Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, US) and homogenised (Polytron PT3100, Kinematica, Switzerland). Tissue protein (40 µg) from each sample was loaded in different lanes of a 12% SDS-polyacrylamide gel. In an additional lane, a control protein (GAPDH; Sigma Chemical Co.; US) was also added. After electrophoretic separation under reducing conditions, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and quenched with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat milk and 0.1% Tween-20. Membranes were subjected to overnight incubation (12 h, 4°C) with rabbit polyclonal antibodies raised against caveolin-1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA, US), cavin-1 (Anti/PTRF/Cavin-1, Millipore, Billerica MA, USA), cavin-2 (SDR, Thermo Scientific, Rockford IL, USA) and cavin-3 (PRKCDBP, Thermo Scientific, Rockford IL, USA), and then washed three times with TBS-Tween-20 (0.1%). Caveolin and cavins were detected by adding horseradish peroxidase-labelled anti-mouse antibodies. Immunoblots were developed using an enhanced chemiluminescent reactant (LumiGLO, Cell Signalling; US) and an optimal exposition of the nitrocellulose sheets to X-ray films (Bio-max ML Film, Kodak, Rochester, NY US). Caveolin-1 and cavin immunoblots were analysed by densitometry using Kodak digital science ID software version 2.03 (Eastman Kodak, Rochester, NY, US).

#### **RNA isolation**

Total RNA from the right lung of some sensitised and non-sensitised ( $n = 3$ , each group) guinea pigs was isolated following the guanidine isothiocyanate-caesium chloride method [30]. Total RNA was examined by 1% agarose gel electrophoresis, and the RNA concentration was determined by UV light absorbance at 260 nm to evaluate the integrity of RNA (Beckman DU640, Fullerton, CA, US).

#### **RT-PCR**

The relative level of caveolin-1 mRNA expression was assessed in left lung homogenates by semi-quantitative



RT-PCR, as previously described [31]. Briefly, all primer sequences were custom ordered from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, US). Sense caveolin-1 primers were amplified to obtain a fragment of 230 bp, bases 1 to 230 (sense 5'-ATG TCT GGG GGT AAA TAC GT-3' and antisense: 5'-CCT TCT GGT TCC GCA ATC AC-3). A fragment of GAPDH was also amplified to evaluate or reduce nonspecific effects of experimental treatment and to semi-quantify caveolin-1 expression. RNA samples were treated with DNase to evaluate genomic DNA contamination relative to samples passed through a PCR procedure without adding reverse transcriptase. RT-PCR was carried out using 2.5 µg of total RNA from lung homogenate. Before the RT-PCR reaction, total RNA was heated at 65°C for 10 min. RT-PCR was performed at 37°C for 60 min in a total volume of 20 µl using 200 U of the Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, US), 100 pM of random hexamers (GIBCO, BRL Gaithersburg, MD, US), 0.5 mM of each dNTP (Sigma, St. Louis, MO, US), and 1× RT buffer (75 mM KCl, 50 mM Tris·HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3). Samples were heated at 95°C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase and diluted to 40 µl with PCR-grade water. One-tenth of RT-PCR individual samples from each group was used for caveolin-1 or GAPDH amplification in 20-µl final volume reactions containing 1× PCR buffer (10 mM Tris·HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8.3), 0.1 mM of each dNTP, 0.2 µCi of [<sup>32</sup>P]-dCTP (3,000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 µCi), 10 µM of each primer, and one unit of Taq DNA polymerase (GIBCO, BRL Gaithersburg, MD, US). Samples were overlaid with 30 µl of mineral oil and PCR cycles were performed in a DNA thermal cycler (M.J. Research, Watertown, MA, US), with the following profile: denaturation for 1 min at 94°C; annealing for 1 min at 55°C and a 1-min extension step at 72°C. The last cycle was followed by a final extension step of 5 min at 72°C. Control gene was co-amplified simultaneously in each reaction. Amplification kinetics were performed following our standard procedure [31]. To analyse PCR products, one-half of each reaction was electrophoresed in a 5% acrylamide gel. Bands were stained with ethidium bromide, visualised under UV light, cut out, suspended in 1 ml of scintillation cocktail (Ecolume, ICN, Aurora, OH, US), and counted by liquid scintillation (Beckman LS6500, Fullerton, CA, US). The amount of radioactivity recovered from the excised bands was plotted in a log scale against the number of cycles. To semi-quantify caveolin-1 and the control gene, all reactions were performed at least in quadruplicate.

#### Conventional histology and automated morphometry analysis

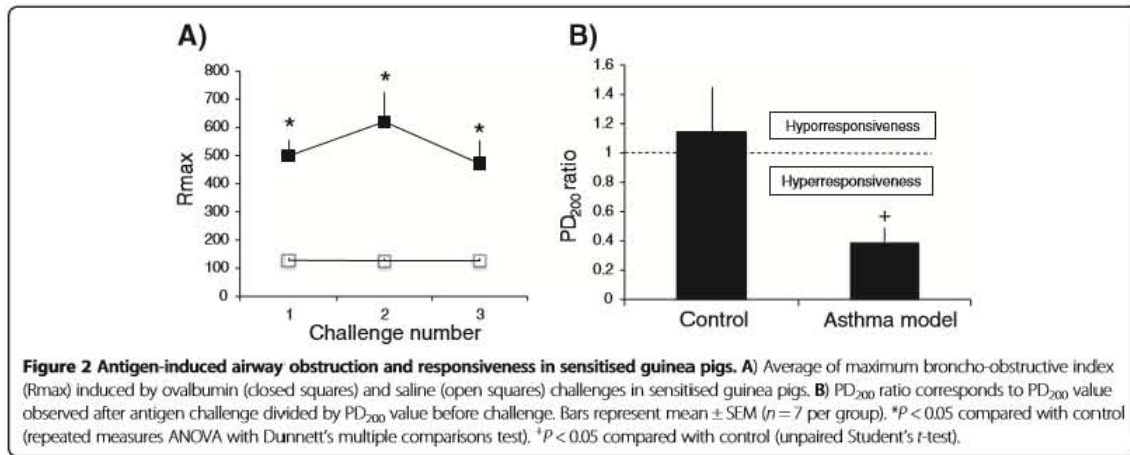
Left caudal lung lobes of some guinea pigs ( $n = 6$ , each group) were dissected and fixed by manual perfusion of 10% neutral buffered formaldehyde solution via intra-arterial route until the lung lobe was exsanguinated. Lung fragments obtained by sagittal cutting were embedded in paraffin, and 4 µm-thick lung sections were stained with Masson trichrome stain. The surface areas (µm<sup>2</sup>) of airway smooth muscle and lamina propria, as well as the vascular smooth muscle of adjacent vessels, were determined through the use of automated morphometry (Qwin, Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK). Data were adjusted by length of the corresponding basement membrane, and their average was considered the final result. All measurements were conducted in six bronchi, six bronchioles and six arterioles (~100 µm diameter) chosen randomly from each animal. Total epithelial cells in six bronchi of each guinea pig were counted and the percentage of goblet cell was obtained. The bronchus and bronchiole were identified by the presence or absence of cartilage in the airway wall, respectively.

#### ELISA

Anti-human interferon-γ (IFN-γ; R&D System, Minneapolis, USA), interleukin-4 (IL-4; R&D System, Minneapolis, USA) and IL-5 (clone TRFK5; BD Pharmingen, USA), antibodies were used in lung homogenates of sensitized and non sensitised guinea pigs ( $n = 6$ , each group) to measure cytokines by ELISA as previously described [27].

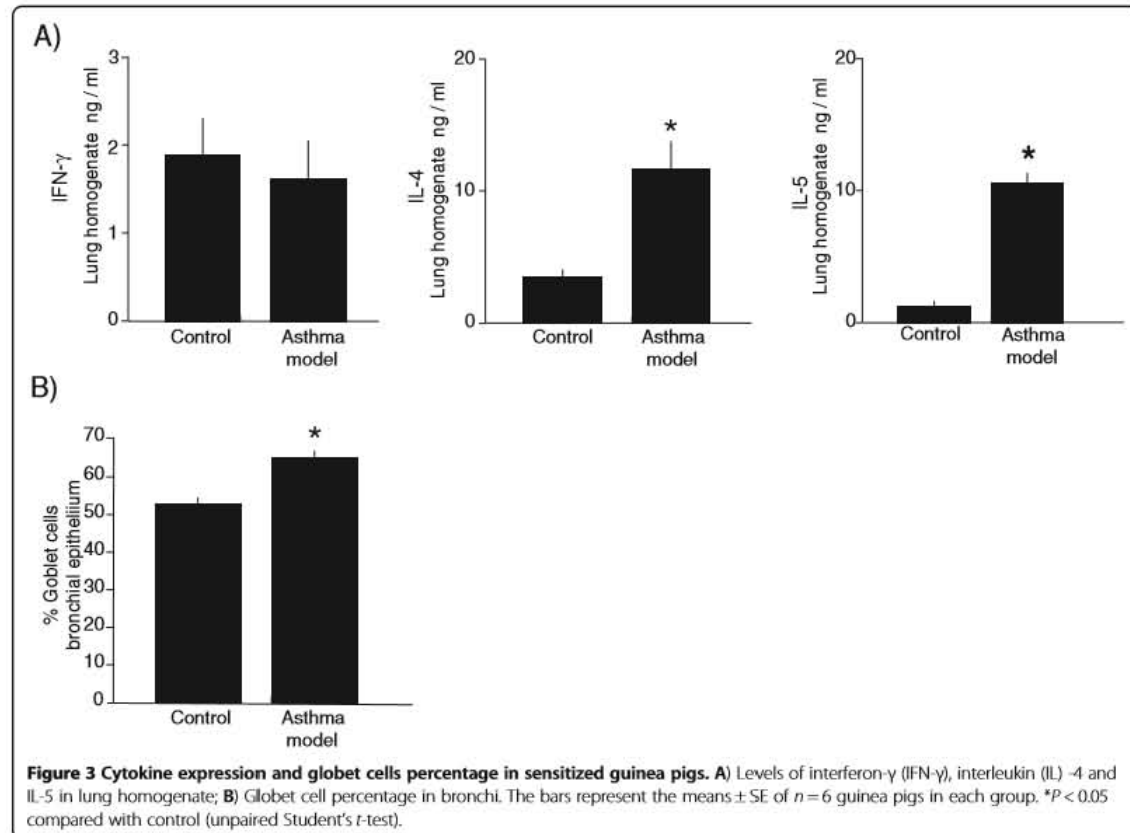
#### Immunohistochemistry and immunofluorescence

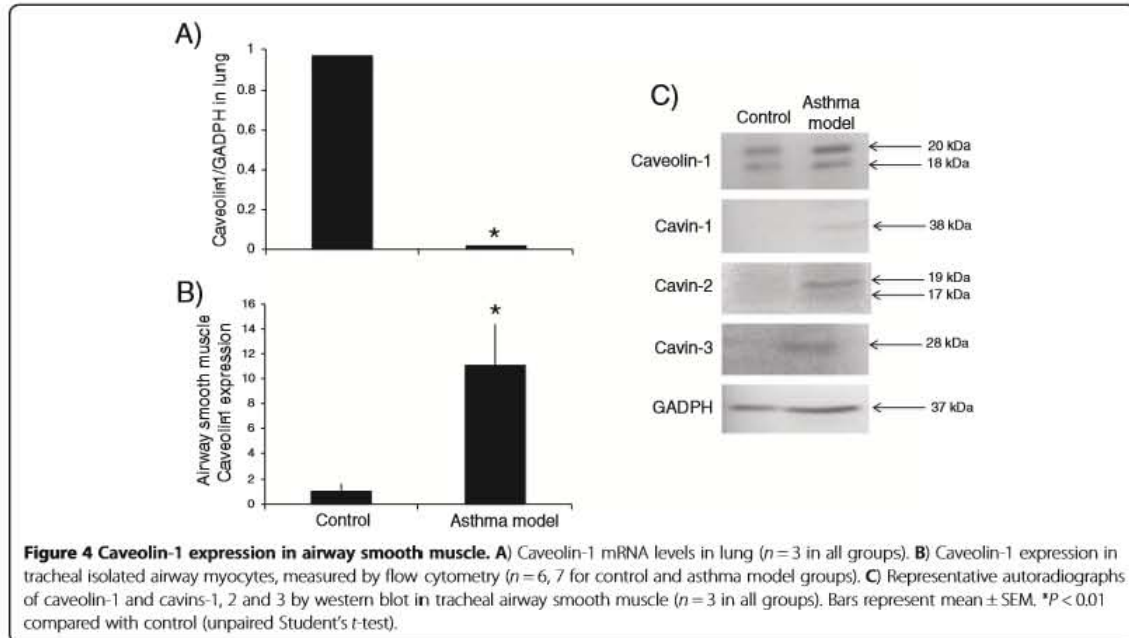
The same paraffin-embedded lung tissue blocks used for the morphometric study were used for immunohistochemistry ( $n = 6$ , each group) and immunofluorescence ( $n = 2$ , each group). Sections (3 µm) were deparaffinised (55°C, 30 min) and rehydrated through submersion in graded alcohols (xylene, 1:1 xylene-alcohol, alcohol, and 70% alcohol for 10 min each, followed by rinsing in distilled water). Antigen retrieval was performed with 10 mM citrate buffer, pH 6, for 5 min in a microwave oven. Samples were treated with hydrogen peroxide (3%) to quench endogenous peroxidase, and nonspecific sites were blocked later with horse serum (2%). Sections were incubated at 4°C overnight with an antibody to caveolin-1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA, US). To detect the specific binding of this primary antibody, an R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit was used (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) in which tissues were incubated sequentially with blocking serum, a pan-specific secondary antibody, and streptavidin/peroxidase complex. Finally, 3-amino-9-ethyl-carbazole (BioGenex,



San Ramon, CA, USA) was used as a chromogen. Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. Slides were rinsed twice with 0.1% Tween-20 phosphate-buffered saline during the whole process. To control for the non-specific binding of the secondary antibody,

sections from the same lung were processed without the primary antibody. No positive staining was observed in non-specific binding controls. The rabbit IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) isotype control was negative.





For the detection of caspase 3 by immunofluorescence, paraffin-embedded tissue was cut 4–6  $\mu$ m thick and tissue sections were placed in slides and incubated for 30 min at 55°C. Tissue slides were deparaffinized in xylenes twice for 10 min each. Hydrate sections gradually through graded alcohols using 2 changes for 10 min each of the following solutions: 100% ethanol, 95% ethanol, and deionized water. For antigen unmasking, slides were covered with 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, and heat at 95°C for 5 min. Slides were then cooled in TBS-T buffer for 20 min at room temperature. To suppress non-specific binding of antibodies, tissue slides were incubated with 0.2% BSA in PBS for 20 min at 4°C. After that, immunofluorescence staining was carried out by overlaying each slide with 20  $\mu$ l of rabbit polyclonal anti-caspase 3 antibody (Abcam, San Francisco, CA, USA) for 2 h at 4°C. After washing in TBS-T buffer for 5 min, a secondary incubation was performed with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Amish Country, PA, USA) for 30 min at 4°C. After twice washing, slides were counterstained with fluoroshield mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) for nuclei staining (blue channel). All incubations were carried out in a humidified dark chamber. In other experiments, tissue slides were incubated only with FITC-labeled secondary antibody, which was used as background staining control. Finally, tissue slides were examined by fluorescence microscope with

appropriate filters (Leica DM-LS 2000, Mannheim, Germany), and analyzed by ImageJ64 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

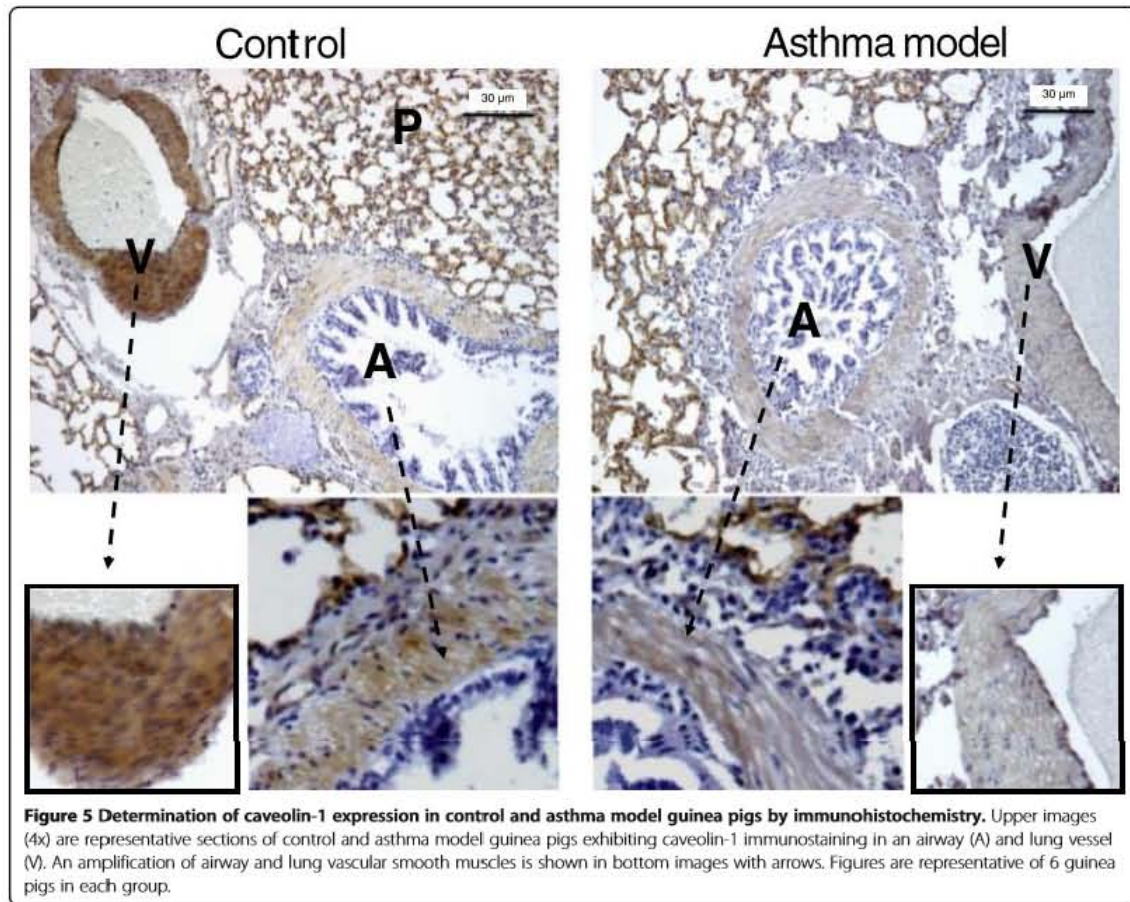
**Hemodynamic**

After 12 h of fasting, some guinea pigs ( $n=8$  for sensitised, and  $n=4$  for non-sensitised) were anaesthetised with isoflurane (1.5%, Sofloran, México, DF) delivered by a precision vaporiser (Isotec 3, Ohmeda, Steeton, West Yorkshire, UK) carried in oxygen. Their heart rates were monitored with an automatic non-invasive device Datascope Passport Model EL (Datascope Corp, Mahwah, NJ, USA), and after deep anaesthesia, animals were ventilated through a trachea cannula that was connected to both, a ventilator (Harvard, Rodent Model Ventilator 683) and the vaporiser. Then, the right carotid artery was dissected, and a catheter was introduced to measure the systemic arterial pressure and diastolic arterial pressure. A similar procedure was performed to introduce a catheter into the pulmonary artery through the right ventricle to determine the pulmonary arterial pressure. Datascope Passport monitored all pressures.

**Materials**

Ovalbumin (chicken egg albumin) grade II and all stains for microscopy were purchased from Sigma Chemical Co. (US). Aluminium hydroxide was purchased from J.T. Baker, USA. Pentobarbital sodium was acquired from Pfizer, Mexico.





### Statistical analysis

Airway responsiveness to histamine was evaluated by means of the provocative dose 200% ( $PD_{200}$ ), i.e., the interpolated histamine dose that caused a three-fold increase of basal broncho-obstructive index. Change in histamine responsiveness induced by antigen challenge was evaluated by the  $PD_{200}$  ratio, i.e.,  $PD_{200}$  value observed after OVA challenge divided by  $PD_{200}$  value before challenge. In multiple comparisons, one-way or repeated-measure ANOVA followed by Dunnett's tests was used. Comparison between control and asthma model groups was evaluated by means of Student's unpaired *t*-test. Associations between caveolin-1 and airway responsiveness and obstruction were assessed through Spearman's correlation coefficient. Statistical significance was set at two-tailed  $P < 0.05$ . Data in the text and figures are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

### Results and discussion

#### Antigen-induced airway obstruction and responsiveness

The guinea pig has served as a helpful model in the study of asthma, with some advantages over other

models such as the rat and mouse, because it shares various pharmacological characteristics of human asthma, besides the strong airway obstructive response that guinea pigs exhibit after agonist stimulation [32]. Responses to antigen challenge in guinea pig asthma models are characterised by a rapid and transient airway obstruction in sensitised animals [23,27]. In the current study, the values of basal airway obstruction index were similar between control and experimental groups (data not shown). Saline challenge did not modify the basal obstruction index in the control group, but ovalbumin challenge induced a transient increase in the index that reached statistical significance in comparison with the control group ( $P < 0.05$ ;  $n = 18$  asthma model, and  $n = 13$  control group; Figure 2A).

An important pathophysiological feature of asthma is the development of airway hyperresponsiveness. In this study, the basal histamine  $PD_{200}$  value was similar between the control and experimental groups (data not shown). In the control group, the histamine  $PD_{200}$  value after saline challenge was similar to the basal  $PD_{200}$

value. In the experimental group, the PD<sub>200</sub> value after ovalbumin challenge was lower than the basal PD<sub>200</sub> value. In the control group, the PD<sub>200</sub> ratio was significantly lower than that obtained in the control group ( $P < 0.05$ ;  $n = 18$  asthma model, and  $n = 13$  control group; Figure 2B), implying that all guinea pigs sensitised with the antigen showed hyperresponsiveness to histamine.

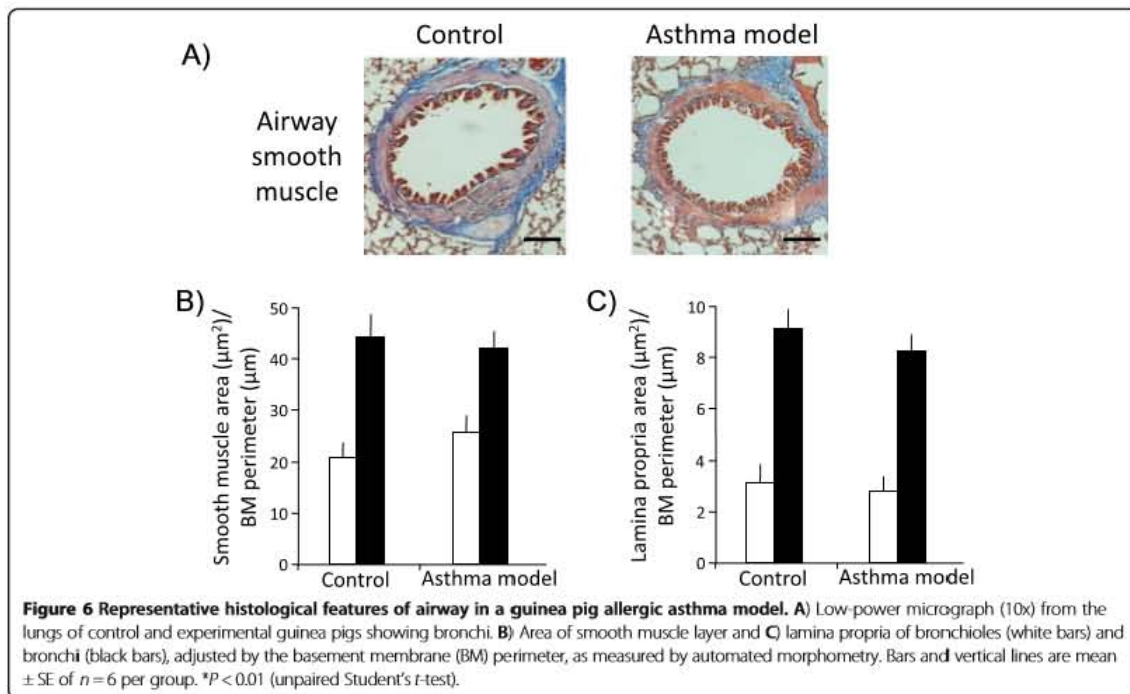
Inflammatory markers in asthma as the Th2 cytokines IL-4 and IL-5 [33] significantly increases in lung homogenates of asthma model guinea pigs in comparison with controls ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$  each group; Figure 3A). In contrast IFN- $\gamma$ , a Th1 cytokine, has similar levels in both groups (Figure 3A). In addition, a significantly increment of goblet cells was observed in bronchi epithelium of asthma model group ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$  each group; Figure 3B) suggesting that this model of acute asthma induces structural changes in airway epithelium.

**Caveolin-1 expression in asthma model**

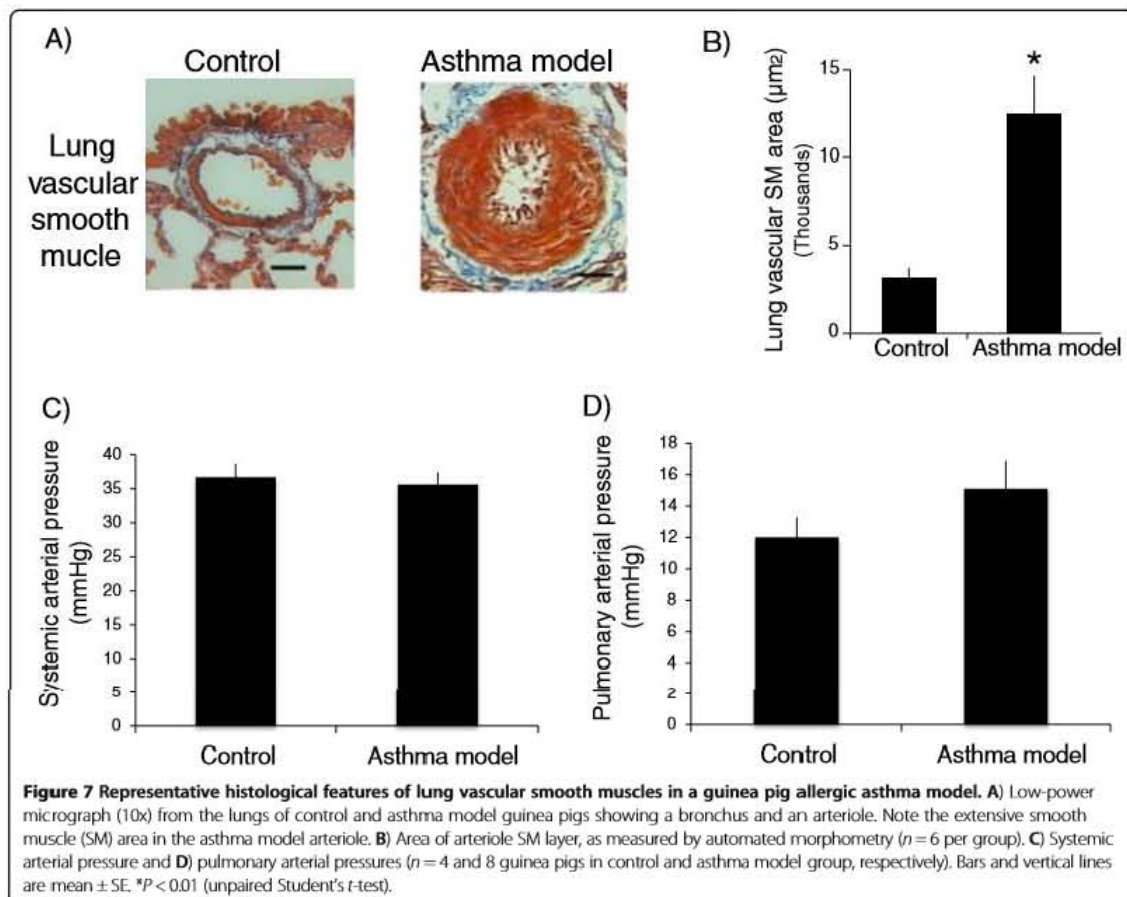
In comparison with other cells, smooth muscle expresses high levels of caveolin-1 in the plasma membrane [34]. In airway smooth muscle, the signalling platform associated with caveolin-1 takes important roles in the recruitment of various signalling proteins involved in contraction. For example, caveolin-1 is involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis via the presence of voltage gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels, the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase, calsequestrin and calreticulin in caveolin-enriched membranes [15]. Other components that

play a role in airway smooth muscle contraction, such as M3 muscarinic, bradykinin, H1 histamine, phospholipase C $\beta$ 1, Gaq and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-regulatory mechanisms, co-localise with caveolin-1 [17,35]. Moreover, TNF- $\alpha$ , a fundamental cytokine in asthma pathogenesis [36], induces RhoA activation, enhances force responses to acetylcholine, and increases Ca<sup>2+</sup> responses to acetylcholine, histamine and bradykinin through caveolin-1 upregulation [18,37,38]. Certainly, caveolin-1 is associated with key molecules that participate in airway smooth muscle contraction.

In agreement with other studies [4-6], we found that caveolin-1 is downregulated in the lung homogenates of experimental animals, as shown in Figure 4A. The level of caveolin-1 mRNA in the lung homogenate of controls was significantly higher in comparison to the experimental group ( $P < 0.01$ ;  $n = 3$  in all groups); nevertheless, flow cytometric studies in isolated myocytes demonstrated that the number of cells that express caveolin-1 increased significantly in the experimental group compared to controls ( $P < 0.01$ ;  $n = 6$  and 7 for control and asthma model groups, respectively; Figure 4B). Similar results in the airway smooth muscle bundles of experimental group animals obtained by immunohistochemistry analysis have been described previously [8]. In our study, we observed that functional changes in the asthma model correlated with the number of smooth muscle cells that expressed caveolin-1. The PD<sub>200</sub> ratio







was inversely correlated with airway smooth muscle caveolin-1 ( $r = -0.517$ ,  $P < 0.05$ ;  $n = 13$ ), implying that a greater number of cells positive for caveolin-1 corresponded to greater antigen-induced airway responsiveness. In addition, the  $R_{\text{max}}$  correlated with the number of cells positive for caveolin-1 ( $r = 0.691$ ,  $P < 0.01$ ;  $n = 13$ ), indicating that antigen-induced airway obstruction is directly associated with caveolin-1 in airway smooth muscle cells.

Western blot analysis detected two specific bands for caveolin-1 at approximately 18 to 20 kDa, and the expression of both bands increased in the experimental group (Figure 4C;  $n = 3$  all groups). In addition, cavins 1, 2 and 3, a group of proteins that, along with caveolin-1, regulates caveolae organisation and function [3], were found in controls but were more highly expressed in the experimental group (Figure 4C;  $n = 3$  in all groups). Previously, cavins 1, 2 and 3 have been found to increase in the airway smooth muscle of ovalbumin-sensitised mice [7]. Although the role of cavins in asthma is unknown, TNF- $\alpha$  induced the upregulation of cavins in airway

smooth muscle, suggesting that inflammation may regulate cavin expression [39].

Immunohistochemical images did not reveal noticeable changes in caveolin-1 staining between controls and asthma model groups in airway smooth muscle or parenchyma (Figure 5;  $n = 6$  all groups); nevertheless a strong reduction of caveolin-1 expression in vascular smooth muscle of the experimental group was observed in comparison with controls (Figure 5). In view that only pulmonary vascular smooth muscle showed a strong reduction in caveolin-1 expression in asthma model, and the other structures did not exhibit changes, it is possible that the intense decrease in caveolin-1 mRNA levels in total lung homogenates (Figure 4A) of the asthma model was likely produced by the downregulation of caveolin-1 in this smooth muscle.

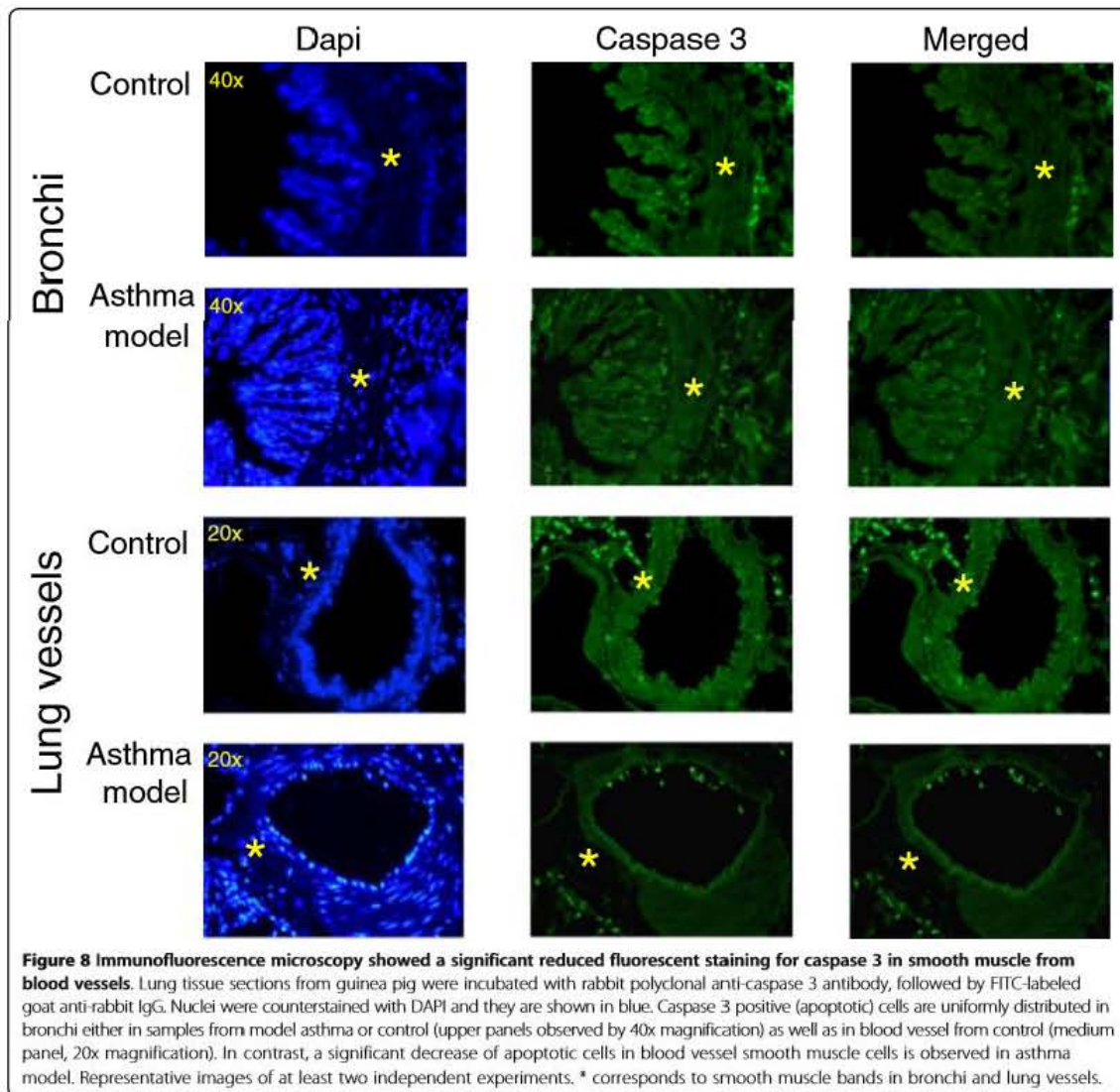
#### Airway and lung vascular smooth muscle structure

Airway remodelling has been proposed as an important factor associated with caveolin in the development of

airway hyperresponsiveness. For example, in a previous study [23] of a model of chronic asthma in guinea pigs (nine antigen challenges), we found an association between subepithelial fibrosis and airway hyperresponsiveness. Caveolin-1 contributes to remodelling by producing suppressive effects in airway smooth muscle proliferation [9], likely through the inhibition of constitutive p42/p44 MAPK activity [40] and by inducing type I collagen in lung tissue [5]. Airway hyperresponsiveness is a consequence of airway remodelling induced by the lack of caveolin-1 in knock-out mice [7,11].

To evaluate airway remodelling in guinea pigs, Masson trichrome staining was used to distinguish airway and lung vascular smooth muscle layers based on their strong red

cytoplasmic staining (Figures 6A and 7A). Automated morphometric analysis of smooth muscle mass and subepithelial fibrosis of bronchioles and bronchi did not show significant differences between control and asthma models (Figure 6B and C;  $n=6$  in control and  $n=7$  in asthma model groups). In addition, we did not observe an association between the degree of hyperresponsiveness and the level of subepithelial fibrosis ( $r=0.25$ ;  $n=13$ ) or airway smooth muscle mass ( $r=0.18$ ;  $n=13$ ). Nevertheless, widening of the airway adjacent vessels was observed ( $P<0.05$ ;  $n=6$  per group; Figure 7A and B). The total numbers of smooth muscle nuclei in bronchioles in the experimental and control groups were similar ( $29 \pm 2.3$  and  $28 \pm 2.5$  nuclei, respectively;  $n=6$  per group, data



not illustrated); however, an increase in the number of total smooth muscle cell nuclei from airway adjacent vessels was observed in experimental guinea pigs compared with controls ( $51 \pm 10.4$  and  $12 \pm 1.2$  nuclei, respectively;  $P < 0.01$ ;  $n = 6$  per group, data not shown). In addition, caspase 3 expression determined by immunofluorescence in bronchi smooth muscle did not show noticeable change in asthma model and control groups; nevertheless, an evident diminution of caspase 3 expression was observed in lung smooth muscle from vessels in asthma model group ( $n = 2$ ; Figure 8). It suggests that apoptosis is inhibited in vascular smooth muscle in asthma model, a tissue that also shows a decrement of caveolin-1 expression (Figure 5) and an enlargement of tissue area (Figure 7B). According to the above, these findings are in agreement with the antiproliferative and proapoptotic effects induced by caveolin-1 observed in almost cell types [41]. Then, in conclusion these results suggest that pulmonary vascular smooth muscle, but not airway smooth muscle, is capable to show remodelling changes in acute asthma model in guinea pigs and that caveolin-1 is associated with this phenomenon.

#### Arterial pressure in asthma model

A feature of the contractile, but not proliferative, airway smooth muscle phenotype is the abundance of caveolae, suggesting that caveolin-1 may have an inhibitory role in airway smooth muscle proliferation [9]. In contrast, the intense diminution of caveolin-1 observed in smooth muscle from airway adjacent vessels in experimental guinea pigs appears to be related to the increase in proliferation. In this sense, it is known that caveolin-1 has a fundamental role in regulating the proliferation of vascular smooth muscle [42]. In mice, the absence of caveolin-1 has been shown to modify arterial filling and increase pulmonary vascular resistance [43]. To determine the putative physiopathological effect of vascular smooth muscle hyperplasia on our experimental guinea pigs, systemic and pulmonary arterial pressures were evaluated. The experimental and control groups did not show differences in systemic or pulmonary arterial pressures ( $n = 4$  in control, and  $n = 8$  in asthma group; Figure 7C and D). Vascular smooth muscle hyperplasia is observed in asthma patients [44], but this hyperplasia is unrelated to pulmonary hypertension because it includes not only hyperplasia of the smooth muscle but also enhanced vascular contractility and impaired vasodilation [45].

#### Conclusions

Our results suggest that the development of antigen-induced airway obstruction and hyperresponsiveness is associated with caveolin-1 expression in airway smooth

muscle in a guinea pig model of asthma. It appears that the model induces the development of two different phenotypes, one contractile in airway smooth muscle and the other proliferative in pulmonary vessels. In addition, although the asthma model induced a strong caveolin-1 downregulation in vascular smooth muscle accompanied by myocyte proliferation, this phenomenon did not induce pathophysiological consequences such as changes in arterial pressure.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MAS, PRR, SSH, RL, FGA, ROZ, RVJ performed the experiments and acquired data. BBP and NAB analysed the data. BBP conceived of and designed the experiments and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

Mayra Álvarez-Santos was supported for his graduate studies by the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and CONACyT for providing a scholarship number 294207. We thank Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for the economic support given to this project.

#### Author details

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Departamento de Hiperreactividad Bronquial, Calzada de Tlalpan 4502, Mexico. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico. <sup>3</sup>Departamento de Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Mexico. <sup>4</sup>Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico. <sup>5</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Department of Nephrology, México, Mexico.

Received: 22 December 2014 Accepted: 7 March 2015

Published online: 26 March 2015

#### References

- Buc M, Dzurilla M, Vriik M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57:331–44.
- Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:551–9. quiz 560–551.
- Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA, Patel HH. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J* 2014.
- Bains SN, Tourkina E, Atkinson C, Joseph K, Tholanikunnel B, Chu HW, et al. Loss of caveolin-1 from bronchial epithelial cells and monocytes in human subjects with asthma. *Allergy*. 2012;67:1601–4.
- Chen CM, Wu MY, Chou HC, Lang YD, Wang LF. Downregulation of caveolin-1 in a murine model of acute allergic airway disease. *Pediatr Neonatol*. 2011;52:5–10.
- Le Saux CJ, Teeters K, Miyasato SK, Hoffmann PR, Bollt O, Douet V, et al. Down-regulation of caveolin-1, an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, in acute allergen-induced airway remodeling. *J Biol Chem*. 2008;283:5760–8.
- Aravamudan B, Vanoosten SK, Meuchel LW, Vohra P, Thompson M, Sieck GC, et al. Caveolin-1 knockout mice exhibit airway hyperreactivity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L669–681.
- Gosens R, Stelmack GL, Bos ST, Dueck G, Mutawe MM, Schaafsma D, et al. Caveolin-1 is required for contractile phenotype expression by airway smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15:2430–42.
- Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:80–8.
- Le Saux O, Teeters K, Miyasato S, Choi J, Nakamatsu G, Richardson JA, et al. The role of caveolin-1 in pulmonary matrix remodeling and mechanical properties. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L1007–1017.



11. Gabehart KE, Royce SG, Maselli DJ, Miyasato SK, Davis EC, Tang ML, et al. Airway hyperresponsiveness is associated with airway remodeling but not inflammation in aging Cav1-/- mice. *Respir Res.* 2013;14:110.
12. Hsia BJ, Pastva AM, Giamberardino CD, Potts-Kant EN, Foster WM, Que LG, Abraham SN, Wright JR, Zaas DW: Increased Nitric Oxide Production Prevents Airway Hyperresponsiveness in Caveolin-1 Deficient Mice Following Endotoxin Exposure. *J Allergy Ther* 2012, Suppl 1.
13. Bergdahl A, Sward K: Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004;82:289–99.
14. Gosens R, Mutawe M, Martin S, Basu S, Bos ST, Tran T, et al. Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med.* 2008;8:741–53.
15. Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE: Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca(2+) handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L1226–1235.
16. Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, Mutawe MM, Hinton M, McNeill KD, et al. Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293:L1406–1418.
17. Prakash YS, Thompson MA, Vaa B, Matabdin I, Peterson TE, He T, et al. Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293:L1118–1126.
18. Hunter I, Nixon GF: Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells. Lipid rafts are essential for TNF-alpha-mediated activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2006;281:34705–15.
19. Taggart MJ, Leavis P, Feron O, Morgan KG: Inhibition of PKCalpha and rhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Exp Cell Res.* 2000;258:72–81.
20. Sathish V, Abcejo AJ, Thompson MA, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM: Caveolin-1 regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx in human airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2012.
21. Vinten J, Johnsen AH, Roepstorff P, Harpoth J, Tranum-Jensen J: Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1717:34–40.
22. Hansen CG, Nichols BJ: Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 2010;20:177–86.
23. Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Vargas MH, Martinez-Cordero E, Ramos-Ramirez P, Alvarez-Santos M, et al. Beta1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:740–51.
24. Smith N, Broadley KJ: Optimisation of the sensitisation conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:183–90.
25. Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G: The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets.* 2008;9:452–65.
26. Rössmeier AR, Larsson AK, Vollmer E, Dahlen SE, Uhlig S, Martin C: Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *Eur Respir J.* 2006;28:603–11.
27. Ramos-Ramirez P, Campos MG, Martinez-Cordero E, Bazan-Perkins B, Garcia-Zepeda E: Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Exp Lung Res.* 2013;39:136–45.
28. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:766–75.
29. Lecoeur H, Ledru E, Gougeon ML: A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J Immunol Methods.* 1998;217:11–26.
30. Sambrook J, Russell DW, Sambrook J: The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
31. Bobadilla NA, Herrera JP, Merino A, Gamba G: Semi-quantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch Med Res.* 1997;28:55–60.
32. Canning BJ, Chou Y: Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21:702–20.
33. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:388–95.
34. Gabella G: Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res.* 1976;170:161–86.
35. Sharma P, Ghavami S, Stelmack GL, McNeill KD, Mutawe MM, Klonisch T, et al. beta-Dystroglycan binds caveolin-1 in smooth muscle: a functional role in caveolae distribution and Ca<sup>2+</sup> release. *J Cell Sci.* 2010;123:3061–70.
36. Brightling C, Berry M, Amrani Y: Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:5–10. quiz 11–12.
37. Sathish V, Abcejo AJ, VanOosten SK, Thompson MA, Prakash YS, Pabelick CM: Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca(2+) in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301:L607–614.
38. Sathish V, Yang B, Meuchel LW, VanOosten SK, Ryu AJ, Thompson MA, et al. Caveolin-1 and force regulation in porcine airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300:L920–929.
39. Sathish V, Thompson MA, Sinha S, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM: Inflammation, caveolae and CD38-mediated calcium regulation in human airway smooth muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1843;2014:346–51.
40. Gosens R, Dueck G, Gerthoffer WT, Unruh H, Zaagsma J, Meurs H, et al. p42/p44 MAP kinase activation is localized to caveolae-free membrane domains in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L1163–1172.
41. Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, Choi AM: Caveolin-1: a critical regulator of lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300:L151–160.
42. Sedding DG, Braun-Dullaeus RC: Caveolin-1: dual role for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:50–5.
43. Maniatis NA, Shinin V, Schraufnagel DE, Okada S, Vogel SM, Malik AB, et al. Increased pulmonary vascular resistance and defective pulmonary artery filling in caveolin-1-/- mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294:L865–873.
44. Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt AK: Pulmonary vascular changes in asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2014.
45. Yildiz P: Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Chim Acta.* 2009;403:9–16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Airway Hyperresponsiveness in Asthma Model Occurs Independently of Secretion of $\beta 1$ Integrins in Airway Wall and Focal Adhesions Proteins Down Regulation

Mayra Álvarez-Santos,<sup>1</sup> Verónica Carbajal,<sup>1</sup> Olivia Tellez-Jiménez,<sup>1</sup> Erasmo Martínez-Cordero,<sup>2</sup> Victor Ruiz,<sup>3</sup> Rogelio Hernández-Pando,<sup>4</sup> Ricardo Lascurain,<sup>5</sup> Alfredo Santibañez-Salgado,<sup>6</sup> and Blanca Bazan-Perkins<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hiperrreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlapan 4502, Col. Sección XVI, México DF 14080, México

<sup>2</sup>Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlapan 4502, Col. Sección XVI, México DF 14080, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlapan 4502, Col. Sección XVI, México DF 14080, México

<sup>4</sup>Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Vasco de Quiroga 15, México DF 14000, México

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 70159, México

<sup>6</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlapan 4502, Col. Sección XVI, México DF 14080, México

### ABSTRACT

The extracellular domains of some membrane proteins can be shed from the cell. A similar phenomenon occurs with  $\beta 1$  integrins ( $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ ) in guinea pig. The putative role of  $\beta 1$  integrin subunit alterations due to shedding in airway smooth muscle (ASM) in an allergic asthma model was evaluated. Guinea pigs were sensitized and challenged with antigen. Antigenic challenges induced bronchoobstruction and hyperresponsiveness at the third antigenic challenge. Immunohistochemistry and immunoelectronmicroscopy studies showed that the cytosolic and extracellular domains of the  $\beta 1$  integrin subunit shared the same distribution in airway structures in both groups. Various polypeptides with similar molecular weights were detected with both the cytosolic and extracellular  $\beta 1$  integrin subunit antibodies in isolated airway myocytes and the connective tissue that surrounds the ASM bundle. Flow cytometry and Western blot studies showed that the expression of cytosolic and extracellular  $\beta 1$  integrin subunit domains in ASM was similar between groups. An increment of *ITGB1* mRNA in ASM was observed in the asthma model group. RACE-PCR of *ITGB1* in ASM did not show splicing variants. The expression levels of integrin-linked kinase (ILK) and paxillin diminished in the asthma model, but not talin. The levels of phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) at Thr<sup>696</sup> increased in asthma model. Our work suggests that  $\beta 1$  integrin is secreted in guinea pig airway wall. This secretion is not altered in asthma model; nevertheless,  $\beta 1$  integrin cytodomain assembly proteins in focal cell adhesions in which ILK and paxillin are involved are altered in asthma model. *J. Cell. Biochem.* 9999: 1–12, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** ASTHMA;  $\beta 1$  INTEGRIN; AIRWAY; HYPERRESPONSIVENESS; INTEGRIN-LINKED KINASE; TALIN; PAXILLIN; AIRWAY SMOOTH MUSCLE

Asthma is an heterogeneous and chronic inflammatory disease that is defined by a history of respiratory symptoms and variable expiratory flow limitation [Global Initiative for Asthma, 2014]. Structural changes induced by pathological repair

mechanisms, called airway remodeling, are a consequence of chronic inflammation and mechanical forces in airways produced by asthma exacerbations [Manuyakorn, 2014]. The structural changes observed in remodeled airways include the accumulation and alteration of

\*Correspondence to: Dr. Blanca Bazan-Perkins, Departamento de Hiperrreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlapan 4502, Colonia Sección XVI, México DF 14080, México. E-mail: perkins@unam.mx

Manuscript Received: 21 August 2015; Manuscript Accepted: 7 March 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2016

DOI 10.1002/jcb.25536 • © 2016 Wiley Periodicals, Inc.



extracellular matrix components, epithelial damage, and goblet cell, airway and vascular smooth muscle hyperplasia [Manuyakorn, 2014; Gosens and Grainge, 2015].

Animal models of asthma are helpful in the understanding of the disease. Previous studies from our laboratory have shown that the guinea pig allergic asthma model generates airway obstruction and hyperresponsiveness, high ovalbumin-IgE and -IgG1 levels, granulocyte infiltration, increased lung levels of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-5, remodeling features of asthma such as goblet cell and vascular smooth muscle hyperplasia, and accumulation and alteration of extracellular matrix components [Bazan-Perkins et al., 2009; Moreno-Alvarez et al., 2010; Ramos-Ramirez et al., 2013; Alvarez-Santos et al., 2015].

The integrins are important cell surface adhesion receptors that recognize extracellular matrix components. They comprise a family of 24 obligate dimers consisting of non-covalently linked  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Integrins are involved in most cell functions, and signals induced by integrins are bidirectional across the plasma membrane. The  $\beta 1$  integrin subunit is particularly important among the eight  $\beta$  subunits due to its capability to associate with at least 12 ( $\alpha 1$ - $\alpha 11$ , and  $\alpha V$ ) of the 18  $\alpha$  integrin subunits [Davignon et al., 1981; Heino and Kapyla, 2009; Barczyk et al., 2010].  $\beta 1$  integrins are widely expressed in airways, and their expression changes in asthma, particularly in airway smooth muscle [Teoh et al., 2012]. In this tissue,  $\beta 1$  integrins are involved in cell differentiation, secretion and proliferation, and in the development of airway remodeling, obstruction and hyperresponsiveness [Abraham et al., 2004; Fernandes et al., 2006; Bazan-Perkins et al., 2009].

In airway smooth muscle  $\beta 1$  integrins has important roles connecting membrane focal adhesion with actin filaments in dense bodies [Gunst and Zhang, 2008]. This focal adhesions requires the assembly and organization of ordered structures which depend on the binding to cytoplasmic adapter proteins to integrins cytodomains such as talin, paxillin, and integrin-linked kinase (ILK) that directly or indirectly connect to the actin cytoskeleton. A major role of focal adhesion is to stabilize contraction or tension through the extracellular matrix/integrin/focal adhesion proteins/actin connections [Wehrle-Haller, 2012]. In addition, some focal adhesion proteins, as ILK, have additional roles phosphorylate some proteins associate to contraction like myosin phosphatase target 1 (MYPT1) that regulates the myosin phosphatase [Muranyi et al., 2002].

Some studies have suggested that integrins can be shed from the cells. For example, in the mouse heart continuous exposure to  $\beta$ -adrenergic stimulation induced  $\beta 1$  integrin cleavage [Menon et al., 2006]. Another study in mice demonstrated that  $\beta 1$  integrin fragments increased the attachment of heart myocytes to extracellular matrix [Goldsmith et al., 2003]. In mouse embryo limb buds,  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  integrin subunits are expressed in the cartilage matrix [Shakibaei et al., 1995]. In humans, inflammatory cells lost  $\alpha \beta 2$  integrin when they transmigrated from blood to inflamed tissues in experimentally induced skin-blister fluid [Evans et al., 2006]. Remarkably, recombinant soluble integrins without cytosolic and transmembrane domains can assemble to form stable, soluble heterodimers that preserve the same ligand binding, functionality, and antigenic activity of the transmembrane integrin [Clark et al., 2000; Fujita et al., 2015]. In other shed receptors such as IL-2 $\beta$ , the

cytoplasmic domain has biological functions [Montes de Oca et al., 2010]. In a guinea pig asthma model,  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins are deposited in airway wall collagenous fibers and myocyte intercellular spaces. The degree of accumulation of these acellular integrins was associated with inflammation, fibrosis, and airway obstruction [Bazan-Perkins et al., 2009]. Nevertheless, it is unknown whether these integrins were shed or secreted. In the present study, we evaluated whether  $\beta 1$  integrins are shed or secreted in airway smooth muscle, and explore the possible effects of this phenomenon in associated integrin cytosolic tail focal adhesion proteins, as talin, paxillin, and ILK, in the asthma pathophysiology in guinea pig.

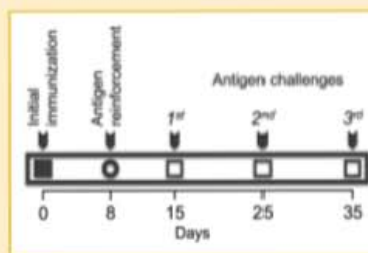
## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

Healthy male guinea pigs were originally purchased from Harlan, Mexico (strain HsdPoc:D11) and reproduced at our institutional laboratory animal facilities. Animals were bred in a filtered, air-conditioned environment at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50-70% humidity, and 12/12-h light/dark cycles and fed with sterilized pellets (2040 Harlan Teklad Guinea-Pig Diet, Madison, WI) and water *ad libitum*. The protocol was revised and approved by the Scientific and Bioethics Committees of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias in Mexico City and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996).

### EXPERIMENTAL DESIGN

The guinea pig asthma model was developed by sensitization to ovalbumin and exposure to the aerosolized antigen for up to 35 days, with a total of three allergen challenges (Fig. 1). The guinea pig bronchial obstruction was measured in all challenges. At the third antigen challenge, the development of antigen-induced airway responsiveness was evaluated by performing dose-response curves to histamine before and after the antigenic challenge. The guinea pigs were euthanized 24 h later, and lung and trachea samples were obtained. The cytosolic and extracellular domain expression of the  $\beta 1$  integrin subunit was explored through flow cytometry,



**Fig. 1.** Experimental design. Guinea pigs were immunized at day 1. Eight days later, this immunization was reinforced by aerosolized antigen (ovalbumin). From day 15-35, guinea pigs received an antigen challenge every 10 days (three challenges in total). At the third challenge, airway responsiveness was evaluated and biological samples were taken for further analysis.

immunohistochemistry, electron microscopy, western blot, RT-PCR, and RACE-PCR. Integrin-linked kinase (ILK), talin, paxillin, and phosphor-MYPT1 expression were also evaluated. Control animals received sham manoeuvres with saline solution.

#### ASTHMA MODEL

Guinea pigs were sensitized, and challenges were performed according to previously described methods [Bazan-Perkins et al., 2009; Ramos-Ramirez et al., 2013]. Antigen sensitization was done by intraperitoneal (0.5 mg/ml) and subdermal (0.5 mg/ml) injections with a combination of 60 µg/ml ovalbumin (chicken egg albumin, grade II; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) combined with aluminum hydroxide (1 mg/ml; J.T. Baker, Center Valley, PA) dispersed in saline solution (Fig. 1). Antigen sensitization was reinforced 8 days later with aerosols of ovalbumin (3 mg/ml saline) delivered over 5 min. Aerosols were produced by a US-1 Bennett nebulizer (flow, 2 ml/min; Multistage liquid impinger, Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Hertfordshire, UK) releasing mixed particles whose size was <4 µm (44%), 4–10 µm (38%), and >10 µm (18%). From day 15 onward, guinea pigs were challenged over 1 min with ovalbumin aerosol every 10 days (1 mg/ml in the first challenge and 0.5 mg/ml in the subsequent challenges; Fig. 1).

A whole-body single-chamber plethysmography for freely moving animals was used (Buxco Electronics Inc., Troy, NY) to evaluate pulmonary function in each antigenic challenge and during histamine dose curves. The signal was processed from the chamber with computer-installed software (Buxco Bio System XA v1.1, Troy, NY) to calculate several respiratory parameters, including the index of airway obstruction Penh. We obtained this index by the following equation [Hamelmann et al., 1997]:

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

where Te = expiratory time (s), Rt = relaxation time (s), PEP = peak expiratory pressure (cmH<sub>2</sub>O), and PIP = peak inspiratory pressure (cmH<sub>2</sub>O). The software was adjusted to include only breaths with a tidal volume of 1 ml or more, with a minimal inspiratory time of 0.15 s, maximal inspiratory time of 3 s, and maximal difference between inspiratory and expiratory volumes of 10%.

#### ANTIGEN-INDUCED AIRWAY RESPONSIVENESS

Airway responsiveness was evaluated at the third antigenic challenge by the administration of non-cumulative doses of aerosolized histamine (0.001–0.32 mg/ml; Sigma) before and after antigen exposition. Histamine doses were delivered over 1 min, and the airway obstructive index over the following 10 min was obtained. The histamine dose interval was 10 min. The dose-response curve finished when the airway obstructive index reached three times its baseline level. The second histamine curve was performed 3 h later.

#### ISOLATION OF AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS

Twenty hours after concluding the second histamine curve, animals were overdosed with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (65 mg/kg; Pfizer, Toluca, Mexico) and the trachea and left lung were obtained. In some tracheas, airway smooth muscle was dissected and incubated for 10 min at 37°C in 5 ml of Hanks' solution

(Gibco, Grand Island, NY) containing 2 mg of cysteine and 0.05 U/ml papain (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Then, tissue was washed in Leibovitz's solution and placed in physiological saline solution (PSS, mM): 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 11 glucose (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Smooth muscle was cut into strips (0.5 × 5 mm) weighing 200 mg total and placed in 2.5 ml PSS containing collagenase type I (1 mg/ml) and dispase II (4 mg/ml) for 10 min at 37°C (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Strips were transferred to PSS containing fresh enzymes. The tissue was dispersed mechanically until isolated cells were observed. Leibovitz's solution was added to stop the enzymatic activity.

#### FLOW CYTOMETRY

To detect β1 integrin subunit production in isolated airway smooth muscle cells, immunofluorescence was used following a method described previously [Lecocur et al., 1998]. Isolated myocytes were incubated with 10 µg/ml brefeldin-A (Sigma) for 4 h to inhibit new cytokine release. After staining, cells were washed, fixed with 4% p-formaldehyde for 10 min at 4°C, washed, and permeabilized with 0.1% saponin in PBS with 10% BSA and 1% NaN<sub>3</sub>. Cells then underwent gentle shaking in the dark for 15 min at room temperature and were labelled with surface marker (1 µl / 1 × 10<sup>6</sup> cells) antibodies to the β1 integrin extracellular subunit (1:75, clone P4G11 mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> raised against calcium-dependent epitopes on the human β1 integrin subunit; Chemicon Int., Temecula, CA) and intracellular subunit (corresponding to the C-terminus of human β1 integrin (a.a. CTTVVNPKYEGK), not reactive with other integrins; Chemicon Int., Temecula, CA). Then, cells were incubated for 30 min with the secondary antibodies FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) and PE rat (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Finally, all cells were analyzed for marker expression on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using Cellquest software, and 10,000 events were counted. To analyse the staining, the blasts were first gated by their physical properties (forward and side scatter). Next, a second gate was drawn based on the fluorescence characteristics of the gated cells, assessing fluorescence intensity by histograms. Intensity of fluorescence staining is expressed as the mean fluorescence intensity. Control stains were performed using fluorochrome-conjugated isotype-matched antibodies. Background staining was <1% and was subtracted from experimental values.

#### IMMUNOHISTOCHEMISTRY

In some guinea pigs, the left caudal lung lobe and trachea were dissected and fixed by manually perfusing 10% neutral buffered formaldehyde solution via an intra-arterial route until the lung lobe was exsanguinated. Sagittal fragments were embedded in paraffin, and sections (3 µm) were deparaffinised (55°C, 30 min), rehydrated through submersion in graded alcohols (xylene, 1:1 xylene-alcohol, alcohol, and 70% alcohol for 10 min each) and finally rinsed in distilled water. Antigen retrieval was performed with 10 mM citrate buffer, pH 6, for 5 min in a microwave oven. Samples were treated with hydrogen peroxide (3%) to quench endogenous peroxidase, and nonspecific sites were later blocked with horse serum (2%). Sections were incubated at 4°C overnight with an appropriate dilution of the same antibody used to recognize the β1 integrin subunit described in



Flow cytometry section. To detect the specific binding of these primary antibodies, the R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit was used (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Tissues were incubated sequentially with blocking serum, a pan-specific secondary antibody, and a streptavidin/peroxidase complex. Finally, 3-amino-9-ethyl-carbazole (BioGenex, Fremont, CA) or diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) was used as the chromogen. Sections were counterstained with Mayers haematoxylin (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Slides were rinsed twice with 0.1% phosphate-buffered saline and Tween 20 during the whole process. As a control for the non-specific binding of the secondary antibody, sections from the same lung were processed without the primary antibody. No positive staining was observed in non-specific binding controls. Rabbit IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL) and mouse IgG<sub>1</sub> (Clone DD7, Chemicon Int., Temecula, CA) isotype controls were negative.

#### ELECTRON MICROSCOPY

We performed immunoelectronmicroscopy to determine the  $\beta 1$  integrin subcellular localization in the trachea and lung. Briefly, five animals were killed at the last ovalbumin challenge and their lungs were perfused with 4% (v/v) paraformaldehyde dissolved in 0.2 M Sørensen buffer for 4 h at 4°C. Then, small tissue fragments were dehydrated in graded ethyl alcohols and embedded in LR-White hydrosoluble resin (London Resin Co., Hampshire, UK). Sections (1  $\mu$ m) were taken from five different tissue blocks per animal, stained with toluidine blue and checked for adventitia layers using conventional light microscopy. Selected tissue blocks were trimmed to reduce the selected area from which 70–90 nm thin sections were obtained and then placed on nickel grids, incubated overnight at 4°C with the same specific antibodies to the cytosolic and extracellular domains of  $\beta 1$  integrin as described in Flow cytometry section, and diluted 1:5 in PBS. After extensive washing with PBS, the grids were incubated for 1 h at room temperature with their respective secondary antibodies conjugated to 5 and 10 nm gold particles (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) diluted 1:20 in PBS. The grids were contrasted with uranium salts (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) and examined with an M-10 Zeiss electron microscope (Karl Zeiss, Jena, Germany). As a negative control, normal rabbit serum was substituted for primary antibody.

#### WESTERN BLOT ASSAY

Tracheal smooth muscle strips without epithelium and connective from control and sensitized guinea pigs were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. To determine integrin  $\beta 1$  intracellular domain, integrin  $\beta 1$  extracellular domain, phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup> and ILK, each tissue was homogenized (Omni TH, Omni-International, Kennesaw, GA), in 250  $\mu$ l of lysis solution containing: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.4 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin 10  $\mu$ g/ml, pepstatin 10  $\mu$ g/ml, and a protease inhibitor cocktail (Set III, cat. 539134; Calbiochem, La Jolla, CA, 1:250 v/v). In the case of talin and paxillin samples, we used another lysis solution containing: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 0.25 % sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),

aprotinin 10  $\mu$ g/ml, pepstatin 10  $\mu$ g/ml, and a protease inhibitor cocktail (Set III, cat. 539134; Calbiochem, La Jolla, CA, 1:250 v/v). Samples were centrifuged at 4°C and 3,000 rpm during 5 min. Total protein content was determined in the supernatant using a commercial kit (Pierce BCA Protein Assay, cat. 23225; Thermo-scientific, Rockford, IL). Eighty micrograms of each sample were loaded into different lanes of 8% and 6% SDS-polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis under reducing conditions. Afterwards, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-Tween (Tween 20, 0.1%) during 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody raised against integrin  $\beta 1$  extracellular domain (M-106, cat. sc-8978, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) 1:1000 v/v, anti-human integrin  $\beta 1$  cytosolic domain (cat. AB1952P, Millipore, Temecula, CA) 1:1000 v/v and monoclonal antibody raised against anti-Talin and anti-Paxillin (cat. 05-1144 and cat. 05-417, Millipore, Temecula, CA, respectively) 1:500 v/v, anti-ILK (cat. WH0003611M1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1:500 v/v, and anti-phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup> (cat. 5163P, MYPT1 antibody sampler kit, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Finally, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (cat. 12-348; Millipore, CA) 1:5000 v/v or goat anti-mouse IgG (cat. 626520, Invitrogen, Frederick, MD) 1:2000 v/v secondary antibodies during 1 h, at 37°C. Immunoblots were developed employing an enhanced chemiluminescent reactant (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, cat. 34096; Thermo Scientific, Rockford, IL). GAPDH was blotted as a control for protein load by using a mouse monoclonal antibody (cat. 39-8600, Invitrogen, Frederick, MD) 1:1000 v/v. These membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG secondary antibody (cat. ab97046, Abcam, Cambridge, MA) 1:10 000 v/v. To determine immunolabeling specificity for integrin  $\beta 1$  we used recombinant human integrin  $\alpha 2\beta 1$  (cat. 5698-A2, R&D systems, Minneapolis, MN) 3  $\mu$ g. In the case of ILK, paxillin, and talin we used guinea pig tracheal epithelium as positive control. Integrins  $\beta 1$ , paxillin, talin, phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup>, and ILK immunoblots were analyzed by densitometry using a ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015.

#### REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

In some guinea pigs, total RNA was extracted from tracheal smooth muscle strips using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY). RNA quality was assessed by resolution on denatured 1% agarose gels and measurement of absorbance ratios at 260/280 nm. One milligram of total RNA was reverse transcribed using 2  $\mu$ g of random primers and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's protocol (Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto, CA). Quantitative real-time PCR amplification was performed using the iCycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). PCR was performed with the cDNA working mixture in a 20 ml reaction volume containing 2  $\mu$ l of cDNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 1  $\mu$ M specific 5' and 3' primers, 1.25 U of Taq DNA polymerase (Roche, Branchburg, NJ), 10 nM fluorescein and 1:50,000 SYBR green (Roche, Indianapolis, IN). Primer pairs for *ITGB1* and *ILK* mRNA

were designed in Primer BLAST. The sequences were 5'-GTGTCTGAAAAGCCAATGCCA-3' and 5'-ACCAGTTAACCTCAG-CACA-3' for *ITGB1* and 5'-TGTCACCTGCCACAAGGTGT-3' and 5'-AGCCGCACTATTCACCTGAT-3' for *ILK* (Invitrogen a part of life Tech Corp, Carlsbad, CA). PCR cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The 18S gene was used as an endogenous gene to normalize the expression (Applied Biosystems® Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (FAM™ MGB Probe, Non-Primer Limited), Thermofisher Scientific, Waltham, MA). After 40 cycles, the delta-Ct method was performed to compare the levels of transcripts. The results were expressed as two elevated to the negative power of the difference between each gene's CT minus the CT from 18S (2-Dct).

#### RACE-PCR

Briefly, 10 µg of total RNA was incubated for 1 h at 37°C with calf intestinal phosphatase (CIP) and 10X CIP buffer to remove the 5' phosphate. Then, the RNA was incubated with a phenol:chloroform mixture and ammonium acetate solution and was centrifuged for 5 min at room temperature at top speed. The aqueous phase was transferred to a new tube and add chloroform. This tube was centrifuged for 5 min at room temperature at top speed. The aqueous phase was transferred to a new tube and add isopropanol to allow to cool on ice for 10 min. Then, this tube was centrifuged at maximum speed for 20 min. The pellet was rinsed with 0.5 ml of cold 70% ethanol and was centrifuged for 5 min at maximum speed. Finally, ethanol was removed carefully and allow pellet to air dry. The RNA was resuspended in RNase free water and treated with TAP at 37°C for 1 h. Then, was added T4 RNA ligase and 5' RACE adapter at 37°C for 1 h. The RNA was resuspended in RNase free water and was added dNTP Mix, Random decamers, 10X RT buffer, RNase inhibitor and M-MLV Reverse Transcriptase and was incubated for 1 h to 42°C. This reaction was added 5' RACE *ITGB1* specific outer primer (10 µM), 5'-GAGAGTGTATCCAAGCGGG-3' 5' RACE outer primer (Invitrogen a part of life Tech Corp) and 1.25 U of Thermostable DNA polymerase and PCR cycling conditions were 94°C for 3 min followed by 40 cycles of 94°C for 30 s and 60°C for 30 s and 72°C for 7 min. Finally, to this reaction was added 5' RACE

*ITGB1* specific inner primer (10 µM) 5'-ACCCTCAGCACATCCTT-CAG-3', 5' RACE inner primer (Invitrogen a part of life Tech Corp, Carlsbad, CA) and 1.25 U of Thermostable DNA polymerase and PCR cycling conditions were the same PCR cycling profile outer 5' RLM-RACE PCR (FirtsChoice®RLM-RACE kit, Waltham, MA). The products obtained were analyzed with an agarose gel with 1 µg/ml ethidium bromide and visualized in an UV transilluminator

#### STATISTICAL ANALYSIS

Airway responsiveness to histamine was evaluated by means of the provocative dose 200% (PD<sub>200</sub>), that is, the interpolated histamine dose that caused a threefold increase of the basal bronchoobstructive index. Changes in histamine responsiveness induced by antigen challenge were evaluated by the PD<sub>200</sub> ratio, that is, the PD<sub>200</sub> value observed after the ovalbumin challenge divided by the PD<sub>200</sub> value before the challenge. Associations between ILK and β1 integrin domains with antigen-induced airway obstruction and responsiveness were assessed through Spearman's correlation coefficient. Comparison between the different molecular weights of β1 integrin domains in smooth muscle and connective tissue were evaluated by means one way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test. Comparisons between control and asthma model groups were evaluated by means of unpaired Student's *t*-tests. Statistical significance was set at two-tailed *P* < 0.05. Data in figures are expressed as the mean ± standard error mean (SEM).

## RESULTS

### AIRWAY OBSTRUCTION AND RESPONSIVENESS INDUCED BY ALLERGEN

In all antigenic challenges, ovalbumin induced a transient airway obstruction in the asthma model group, and the average of maximal responses (Rmax) was significantly higher in the asthma model group than the control group (*P* < 0.01; *n* = 6 and 9 for control and asthma model groups, respectively; Fig. 2A).

Airway responsiveness was evaluated by comparing histamine responses before and after antigenic challenges. The PD<sub>200</sub> value

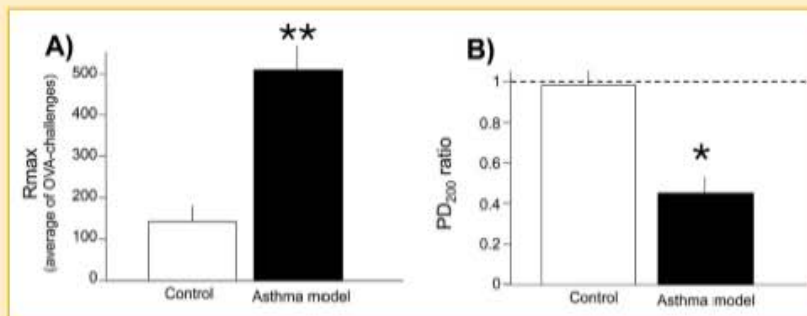


Fig. 2. Antigen-induced airway obstruction and responsiveness in ovalbumin sensitized guinea pigs. (A) Rmax corresponds to the maximal response to antigen (asthma model) or saline (control) challenges. Data are the average of the three antigen challenges. (B) PD<sub>200</sub> ratio corresponds to PD<sub>200</sub> value observed after antigen challenge divided by PD<sub>200</sub> value before challenge. Bars represent mean ± SEM (control *n* = 6, black bars; asthma model *n* = 9, white bars). \*\* *P* < 0.01, \* *P* < 0.05 compared with control (unpaired Student's *t*-test). Dotted line in B shows the border between hypo- and hyperresponsiveness.



after saline challenge was similar to the pre-challenge PD<sub>200</sub> in the control group, while the asthma model PD<sub>200</sub> after the third ovalbumin challenge was lower than the PD<sub>200</sub> value obtained before the challenge. The PD<sub>200</sub> ratio was close to one in the control group, which was significantly higher than that obtained in the asthma model group ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$  and  $9$  for control and asthma model groups, respectively; Fig. 2B).

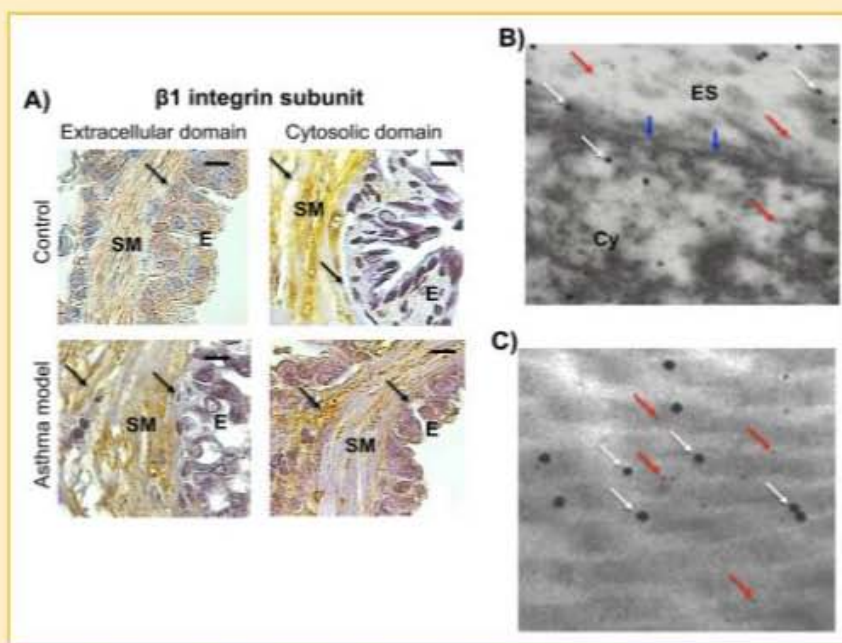
### β1 INTEGRIN CYTOSOLIC AND EXTRACELLULAR DOMAIN IMMUNOLocalIZATION

In a previous study, we observed that the β1 integrin extracellular domain was located not only in cells but also in connective tissue in guinea pigs [Bazan-Perkins et al., 2009]. Here, we evaluated the immunolocalization of the β1 integrin cytosolic domain in the airway wall. The distribution of both β1 integrin domains in the airway smooth muscle and epithelium was similar in the asthma model and the controls. Unexpectedly, the cytosolic domain shared the same localization as the extracellular domain in the acellular areas of the adventitia layer and the lamina propria (black arrow, Fig. 3A). Using immunoelectronmicroscopy, we confirmed that the β1 integrin cytosolic and extracellular domain immunolabelling was associated with the collagen fibers that surround the smooth muscle (Fig. 3B) and the adventitia layer (Fig. 3C).

### β1 INTEGRIN EXPRESSION IN ISOLATED TRACHEAL MYOCYTES AND CONNECTIVE TISSUE

In control and asthma model groups the number of airway smooth muscle cells that express the cytosolic β1 integrin subunit domain was similar to the number of cells expressing the extracellular domain (Fig. 4A). No correlation was observed between these pathofunctional variables and the extracellular or cytosolic β1 integrin subunit (Cytosolic domain vs. R<sub>max</sub> and PD<sub>200</sub> ratio:  $r = 0.31$ ,  $P = 0.13$ , and  $r = -0.30$ ,  $P = 0.14$ , respectively; extracellular domain vs. R<sub>max</sub> and PD<sub>200</sub> ratio:  $r = 0.41$ ,  $P = 0.07$ , and  $r = -0.34$ ,  $P = 0.11$ , respectively,  $n = 15$ ).

In isolated smooth muscle cells and connective tissue that surrounds trachea smooth muscle in control and asthma model guinea pigs, antibodies directed against the β1 integrin cytosolic and extracellular domains detected bands corresponding to 130 and 100 kDa polypeptides (Fig. 4B). The relative intensity of cytosolic and extracellular domain bands was similar in cells and connective tissue in all groups. In connective tissue, significantly increased extracellular domain polypeptides fragments with molecular weights corresponding to 50, 55, and 60 kDa in comparison with the similar molecular weights fragments detected with the cytoplasmic domain antibody in the control groups ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$  each group; Table I). In addition, the expression of β1 integrin



**Fig. 3.** Determination of the β1 integrin subunit cytosolic and extracellular domains in the airway wall. (A) Representative sections of bronchiole wall showing β1 integrin cytosolic and extracellular domain immunostaining in asthma model and control guinea pigs. The distribution of the staining was similar between the groups (black arrows). Bar corresponds to 10 μm. SM: smooth muscle and E: epithelium. Representative micrographs (B–C) of β1 integrin extracellular and cytosolic domain localization determined by immunoelectronmicroscopy after three ovalbumin challenges. Immunoreactivity to β1 integrin detected by antibodies labelled with colloidal gold (black dots) directed to the extracellular domain (big dots, white arrows) and to the cytosolic domain (small dots, red arrows) seen in collagen fibers from the extracellular space (ES) and the cytoplasm (Cy) of a smooth muscle cell (B) and fibrous tissue from adventitia (C). Blue arrows show the plasma membrane of the smooth muscle. Immunoelectronmicroscopy magnification correspond to  $\times 31,000$  (B) and  $\times 80,000$  (C).

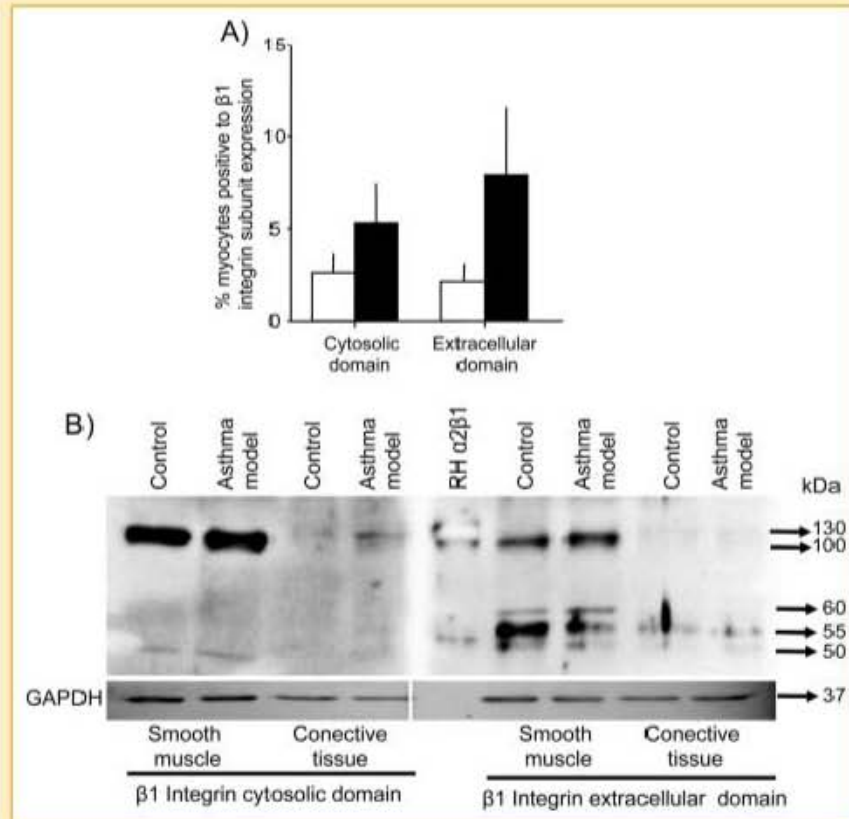


Fig. 4.  $\beta 1$  integrin expression in airway myocytes and connective tissue. (A) Cytosolic and extracellular  $\beta 1$  integrin expression in isolated airway myocytes measured by flow cytometry in asthma model guinea pigs ( $n = 9$  and  $6$ , asthma model (black bars) and control (white bars), respectively). Bars represent mean  $\pm$  SEM. (B) Representative Western blots of the  $\beta 1$  integrin cytosolic and extracellular domains in isolated smooth muscle cells and connective tissue of the adventitia of the guinea pig asthma model.

extracellular domain polypeptide with molecular weight of 100 kDa was higher in smooth muscle than in connective tissue ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$  each group; Table I).

To determine if the different bands found in the electrophoresis were produced by alternative splicing of the  $\beta 1$  integrin subunit in airway smooth muscle cells, we studied the protein at the gene level. Quantitative RT-PCR showed increased *ITGB1* gene expression in the asthma model compared with controls ( $P < 0.001$ ;  $n = 6$  each group; Fig. 5A). To determine the putative transcriptional variants of *ITGB1*, smooth muscle mRNA was analyzed by RACE-PCR. In this study, only one band with a molecular weight of approximately 2,000 base pairs was obtained in both control and asthma model guinea pigs ( $n = 5$ , each group; Fig. 5B). This band could represent the whole length of the *ITGB1* gene.

#### ILK, PAXILLIN, TALIN, AND PHOSPHO-MYPT1 EXPRESSION IN SMOOTH MUSCLE

Electrophoresis with an antibody against ILK shows a band at 50 kDa (insert, Fig. 6A). The relative intensity of this band was significantly higher in the control group than in the asthma model animals

( $P < 0.001$ ;  $n = 6$ ; Fig. 6A). This decreased ILK expression was also observed at the gene level ( $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ; Fig. 6B). As seen in Figures 6C and D, ILK protein levels had an inverse relation with bronchoobstruction and airway hyperresponsiveness degree ( $P < 0.01$ ,  $n = 10$ ).

Paxillin showed two bands with molecular weights at 68 and 50 kDa (inset in Fig. 7A). The relative intensity of the both polypeptides significantly diminished in asthma model group ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ ; Fig. 7A). Talin also showed two bands (270 and 250 kDa) and the relative intensity was similar between groups ( $n = 4$ ; Fig. 7B).

Phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup> polypeptide had molecular weight of 130 kDa that increase its expression in asthma model group in comparison with controls ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$ ; Fig. 7C).

#### DISCUSSION

Among cell adhesins, integrins are key cell sensors of extracellular matrix components [Hynes, 2002]. Although it is recognized that the extracellular matrix components are modified in asthma, little is



**TABLE 1.** Relative Intensity of  $\beta 1$  Integrin Cytosolic and Extracellular Domain Bands in Smooth Muscle and Connective Tissue in Asthma Model Guinea Pigs

kDa	$\beta 1$ integrin cytosolic domain				$\beta 1$ integrin extracellular domain			
	Smooth muscle	Asthma model	Control	Connective tissue	Smooth muscle	Asthma model	Control	Connective tissue
130	—	—	2.2 ± 0.7	2.4 ± 0.8	2.0 ± 0.5	2.3 ± 0.5	3.8 ± 0.8	1.5 ± 0.3
100	—	—	1.7 ± 0.5	1.5 ± 0.4	6.9 ± 1.3	8.9 ± 0.8	2.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.3
100–130	18.3 ± 6.6	14.6 ± 5.6	3.8 ± 0.8	4.3 ± 1.2	9.5 ± 2.0	11.3 ± 1.2	7.3 ± 1.7	3.7 ± 0.6
60	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.6	1.5 ± 0.6	3.4 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.7
55	1.6 ± 0.3	2.1 ± 1.1	3.8 ± 1.3	2.7 ± 1.5	7.8 ± 2.0	10.5 ± 1.8	14.0 ± 2.7 <sup>b</sup>	8.6 ± 1.6
50	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.6	2.6 ± 0.6	3.7 ± 0.7	4.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.5

Relative intensity of  $\beta 1$  integrin subunit bands.

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

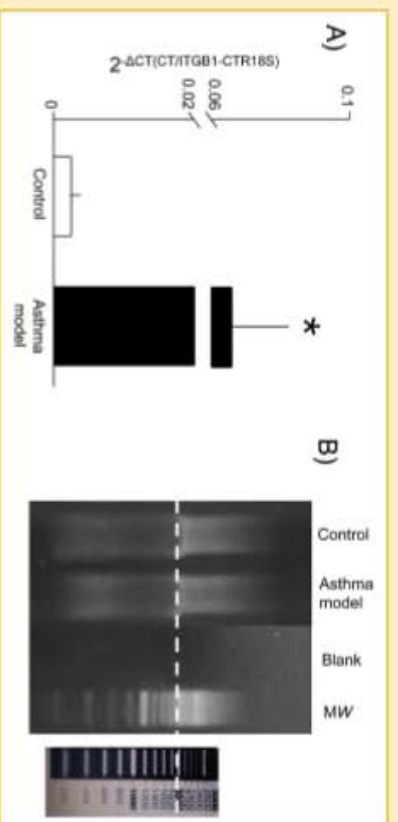
<sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with  $\beta 1$  integrin cytosolic domain expression in connective tissue of control group.

<sup>c</sup> $P < 0.01$  compared with  $\beta 1$  integrin extracellular domain expression in smooth muscle of control group (one way ANOVA with Bonferroni's selected comparisons test).  $n = 4$  each group. Values corresponds to mean ± SEM.

known about the role of integrins in asthma. Recently, using the same asthma model as this study we observed that the accumulation of  $\beta 1$  integrin in collagen fibers and airway smooth muscle bundles was associated with the degree of airway fibrosis, inflammation, and hyperresponsiveness [Bazan-Perkins et al., 2009]. In this scenario, integrin overproduction and shedding in smooth muscle is a putative mechanism that could contribute to this accumulation. However, in our current study we found that the  $\beta 1$  integrin extracellular and cytosolic domain levels in airway smooth muscle cells were alike in control and asthma model guinea pigs, suggesting that  $\beta 1$  integrin is neither overproduced at the protein level nor shed from the smooth muscle.

Smooth muscle is the main airway tone controller as well as the principal actor in contraction. In general terms, contraction is the result of integrin associated cytoskeleton rearrangements in the smooth muscle. Because the  $\beta 1$  integrin cytoplasmic tail lacks

enzymatic activity, during contraction the cytoskeleton rearrangements or cell signaling depend on the recruitment of effector and adaptor proteins to the integrin tail. An important integrin cytoplasmic effector molecule is ILK, a pseudokinase involved in actin filament rearrangement, focal adhesion assembly, and the conduction of forces to the extracellular matrix [Qian et al., 2005; Eckes et al., 2014]. Some authors have suggested the importance of ILK expression in smooth muscle. For example, it is known that ILK is capable to phosphorylate directly by MYPT1 at Thr<sup>696</sup>. MYPT1 is the regulatory subunit myosin light chain phosphatase (MLCP), a pivotal protein involved in smooth muscle relaxation. Phosphorylation of specific sites in MYPT1 can induced inhibition or stimulation of MYPT1 activity. In particular, the phosphorylation of Thr<sup>696</sup> of MYPT1 inhibits the activity of MLCP and promotes the contraction [Feng et al., 1999; Velasco et al., 2002]. We expected that decrement of expression of ILK induced a decrement in phospho-MYPT1 at



**Fig. 5.** *ITGB1* expression in tracheal myocytes of asthma model guinea pigs. (A) RT-PCR bars represent mean ± SEM in asthma model (black bars) and control (white bars) ( $n = 6$ , respectively). \* $P < 0.001$  compared with control (unpaired Student's  $t$ -test). (B) RACE-PCR of *ITGB1* gene in airway smooth muscle of the trachea. Figure is representative of five animals per group.

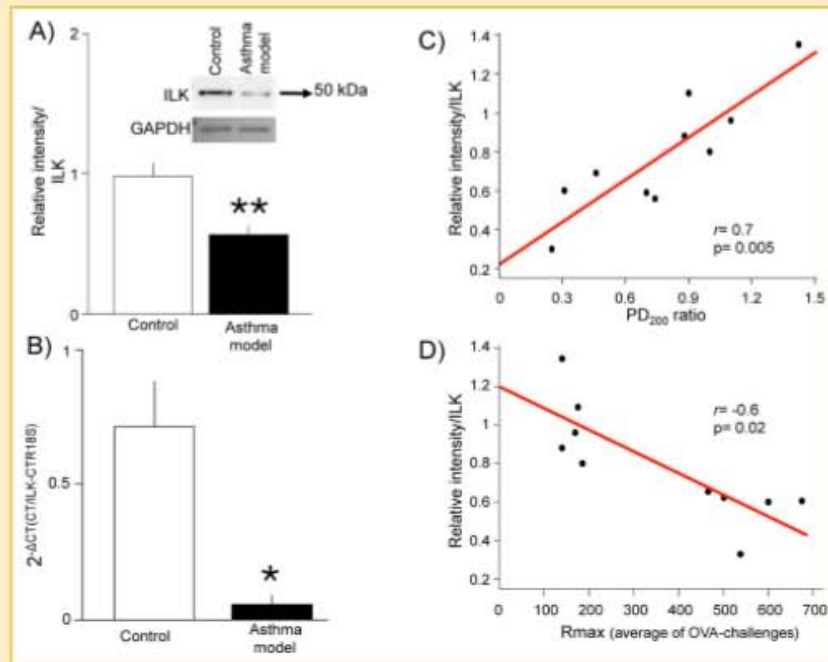


Fig. 6. Integrin-linked kinase (ILK) expression in airway myocytes. (A) Relative intensity of ILK Western blot band of 50 kDa. Inset is representative of Western blot from six control and asthma model guinea pigs. (B) RT-PCR of *ILK* gene ( $n = 5$ , both groups). Bars represent mean  $\pm$  SEM in asthma model (black bars) and controls (white bars). \*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$  compared with its respective control group (unpaired Student's  $t$ -test). (C) Scatter-graphs showing that ILK relative intensity correlated with extent of  $PD_{200}$  ratio [i.e., change of histamine provocative dose after antigenic challenge, as compared with basal [pre-challenge] value], and (D) inversely correlated with extent of  $R_{max}$  (average of OVA-challenges).  $r =$  Spearman correlation coefficient.

Thr<sup>606</sup>, but was the opposite. Then ILK is not a main kinase in the phosphorylation of this protein, and it is known that other kinases as ROK phosphorylates this site.

Other studies suggest that ILK has other roles. Wu and co-workers demonstrated that ILK depletion in the tracheal smooth muscle cells of mongrel dogs increased the expression of differentiation genes [Wu et al., 2008]. Interestingly, Montanez and co-workers demonstrated that ILK depletion displays a hypercontractile phenotype in vascular smooth muscle cells [Montanez et al., 2009]. Our current data agree with this last finding, in that airway hyperresponsiveness and bronchoobstruction degree are inversely related to the ILK level in airway smooth muscle. In addition, the appropriate assembly of integrin  $\beta 1$  signaling complex organisation in vivo is associated with ILK expression [Zong et al., 2009]. Therefore, our findings suggest that the decreased ILK could reflect altered  $\beta 1$  integrin assembly in airway smooth muscle of asthma model guinea pigs.

Other proteins involved in focal adhesion assembly are paxillin and talin. It seems that both proteins are involved in different roles in focal adhesions. For example, it is known that paxillin is fundamental for the initiation of actin polymerization during the contractile activation of smooth muscle, and is associated to ILK complex (ILK/PINCH/ $\alpha$ -parvin) [Zhang et al., 2007; Gunst and

Zhang, 2008]. Talin is needed for the maintenance of the  $\beta 1$  integrin expression, but not its activation, and also talin binding to the integrin  $\beta 1$  prevents its degradation [Liu et al., 2011]. In our study, we observed a decrement in paxillin expression was similar to the decrement of ILK, suggesting that both might be associated in guinea pig smooth muscle; nevertheless, talin expression levels was not modified in asthma model. It has been suggested that there are different types of focal adhesions defined by their subcellular location, size, and composition [Wozniak et al., 2004]. Then, it seems that the focal adhesions associated with talin were not altered in asthma model, but the ones in which ILK and paxillin are involved diminished or are disassembled.

The  $\beta 1$  integrin subunit in human and guinea pig is an 88 kDa polypeptide with approximately 92.6% degree of homology at the amino acid level (BLAST network service at Swiss Institute of Bioinformatics), suggesting a close immunochemical similarity between the species. Post-transcriptional modifications such as glycosylation and phosphorylation could induce polypeptide molecular weight modifications. The  $\beta 1$  integrin subunit has 12 and 5 putative glycosylation and phosphorylation sites, respectively, [Zheng et al., 1994; Mulrooney et al., 2001]. In human, partial glycosylation in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus generates an immature prevalent polypeptide of 105–110 kDa that is

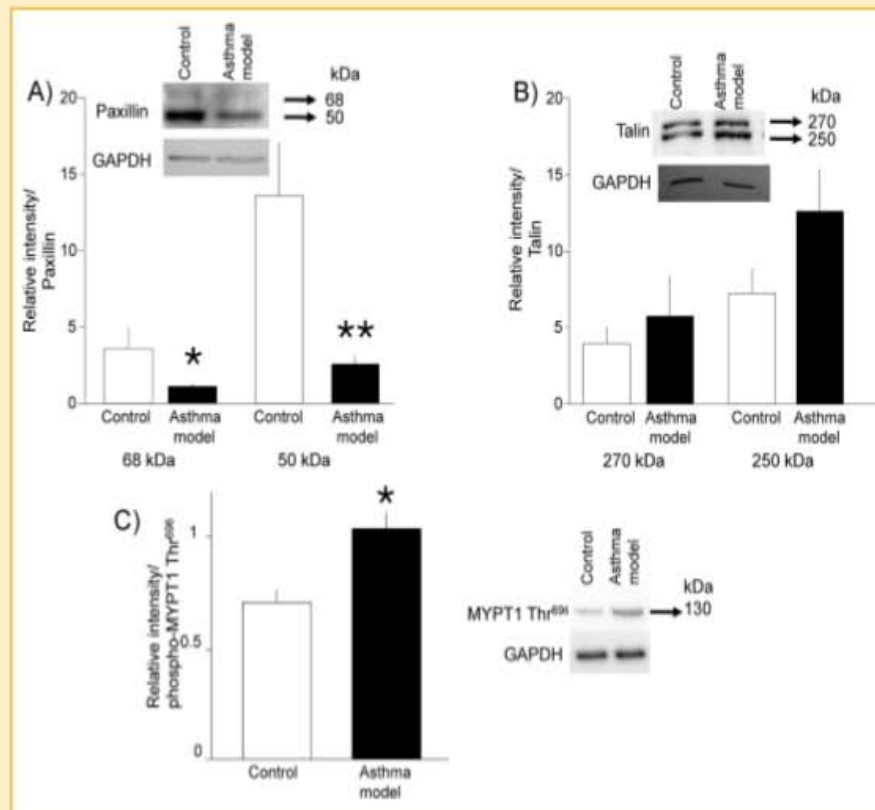


Fig. 7. Paxillin, talin and MYPT1 expression in airway myocytes. Relative intensity of (A) Paxillin (bands of 68 and 50 kDa) and (B) Talin (bands of 270 and 250 kDa) Western blots. Insert is representative of Western blot from four control and asthma model guinea pigs, respectively. (C) Relative intensity of phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup>. Insert is representative of Western blot from six control and asthma model guinea pigs, respectively. Bars represent mean  $\pm$  SEM in asthma model (black bars) and controls (white bars). \*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$  compared with its respective control group (unpaired Student's *t*-test).

not found in the plasma membrane. The functional mature form of  $\beta 1$  integrin at the cell surface is approximately 125–130 kDa [Argaves et al., 1987; She et al., 2010]. In our study, we found that both antibodies recognized the 100 and 130 kDa polypeptides in smooth muscle, suggesting that some of these polypeptides correspond to the immature and the mature integrin. Surprisingly, the two polypeptides (100 and 130 kDa) were also detected in connective tissue, where the most abundant component is collagen [Gelse et al., 2003]. Using electronimmunomicroscopy we confirmed that both the extracellular and the cytosolic domains of  $\beta 1$  integrin are located over collagen fibers, and no cell membranes debris was found in this location.

The  $\beta 1$  integrin subunit is unable to interact with extracellular matrix components, and the binding of  $\beta 1$  integrin to collagen must occur through the I-domain found in the  $\alpha$  integrin subunits [Popova et al., 2007]. Some  $\beta 1$  integrins, such as  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$ , and  $\alpha 11\beta 1$ , are collagen receptors. Accordingly, the  $\beta 1$  integrin subunit near collagen was likely associated with an  $\alpha$  integrin subunit. The presence of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  integrin subunits in these same areas was previously described [Bazan-Perkins et al.,

2009]. The integrins found in these acellular areas are likely  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ , without discarding other integrins.

Until now, we have ignored whether the cytosolic domains of integrins have been found extracellularly. However, evidence regarding shed and soluble integrins has been documented using integrin extracellular domain antibodies. In inflammatory sites, macrophage efflux in mice is promoted by  $\beta 2$  integrin shedding by metalloproteinases, a process that limits local inflammation [Gomez et al., 2012]. In addition, the soluble  $\alpha 1$  integrin subunit has been found in human plasma [Bank et al., 1999]. In contrast, the secretion of receptors is an extremely uncommon phenomenon. Secreted insulin receptor was found in plasma as a soluble functional protein [Papa et al., 1993]. Therefore, it is probable that integrins could also be produced as secreted proteins, at least in guinea pig.

A main recognized role of membrane receptor ectodomain fragmentation in stimulated and non-stimulated cells is the modulation of receptor function and protein turnover [Arribas and Borroto, 2002]. In addition, in colon cancer shed  $\beta 1$  integrins induce other effects as the decrement of cell adhesion and the



enhanced of cell motility [Kryczka et al., 2012]. In fact  $\beta 1$  integrin shed fragments may alter cellular interaction with extracellular matrix components, then these fragments in myocytes induced the attachment to collagen but not to other ligands as fibronectin or laminin [Goldsmith et al., 2003]. It is possible that the soluble  $\beta 1$  integrin fragments has similar roles that the described with the shedded integrins fragments acting as soluble ligands in airways.

Western blotting detected an increase in the extracellular domain of  $\beta 1$  integrin only in connective tissue in the control group. Two mechanisms that could induce this increase are protein shedding or mRNA alternative splicing. To evaluate the second possibility, *ITGB1* mRNA was measured in myocytes, and increased gene expression was detected in the asthma model group. *ITGB1* mRNA was highly produced in the asthma model, but the RACE-PCR only shows a 2,000 base pair band, indicating that the *ITGB1* mRNA did not have splicing variants. The protein may be post-translationally modified.

In conclusion, our data suggest that  $\beta 1$  integrin is secreted in guinea pig airway wall, and these proteins are capable of attaching to collagen.  $\beta 1$  integrin was likely not properly assembled in the focal adhesions that contains ILK and paxillin in the airway smooth muscle in the asthma model. In addition, ILK is not involved in the development of airway hyperresponsiveness. It is possible that  $\beta 1$  integrin subunit polypeptides are shed by cells other than smooth muscle in the guinea pig airways. An important mechanism that could contribute to airway hyperresponsiveness in asthma model is the up regulation of phospho-MYPT1 Thr<sup>696</sup>.

## ACKNOWLEDGMENTS

Mayra Alvarez-Santos was recipient of a Ph.D. scholarship from CONACYT (#294207) and is a doctoral student of Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for the economic support given to this project.

## LITERATURE CITED

Abraham WM, Ahmed A, Serebriakov I, Carmillo AN, Ferrant J, de Fougerolles AR, Garber EA, Gotwals PJ, Koteliensky VE, Taylor F, Lobb RR. 2004. A monoclonal antibody to  $\alpha 1\beta 1$  blocks antigen-induced airway responses in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 169:97-104.

Alvarez-Santos M, Ramos-Ramirez P, Gutierrez-Aguilar F, Sanchez-Hernandez S, Liscuirain R, Olmos-Zuniga R, Jasso-Victoria R, Bobadilla NA, Bazan-Perkins B. 2015. Antigen-induced airway hyperresponsiveness and obstruction is related to caveolin-1 expression in airway smooth muscle in a guinea pig asthma model. *Clin Transl Allergy* 5:14.

Angraves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1987. Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* 105:1183-1190.

Arribas J, Borroto A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102:4627-4638.

Bank I, Weiss P, Doolman R, Book M, Sela BA. 1999. Detection of soluble  $\alpha 1\beta 1$  integrin in human serum. *J Lab Clin Med* 134:599-604.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res* 339:269-280.

Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Vargas MI, Martinez-Cordero E, Ramos-Ramirez P, Alvarez-Santos M, Hiriart G, Gaxiola M, Hernandez-Pando R. 2009.  $\beta 1$ -integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy* 39:740-751.

Clark K, Newham P, Burrows L, Askari JA, Humphries MJ. 2000. Production of recombinant soluble human integrin  $\alpha 4\beta 1$ . *FEBS Lett* 471:182-186.

Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K, Springer TA. 1981. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): A surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4535-4539.

Eckes B, Krieg T, Wickstrom SA. 2014. Role of integrin signalling through integrin-linked kinase in skin physiology and pathology. *Exp Dermatol* 23:453-456.

Evans BJ, McDowall A, Taylor PC, Hogg N, Haskard DO, Landis RC. 2006. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response. *Blood* 107:3593-3599.

Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. 1999. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 274:37385-37390.

Fernandes EJ, Bonacci JV, Stewart AG. 2006. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets* 7:567-577.

Fujita M, Zhu K, Fujita CK, Zhao M, Lam KS, Kurth MJ, Takada YK, Takada Y. 2015. Proinflammatory secreted phospholipase A2 type IIA (sPLA-IIA) induces integrin activation through direct binding to a newly identified binding site (site 2) in integrins  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 4\beta 1$ , and  $\alpha 5\beta 1$ . *J Biol Chem* 290:259-271.

Gelse K, Poschl E, Aigner T. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531-1546.

Global Initiative for Asthma. 2014. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Revised 2014. GINA <http://www.ginasthma.com>

Goldsmith IC, Carver W, McFadden A, Goldsmith JG, Price RL, Sussman M, Lorell BH, Cooper G, Borg TK. 2003. Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2227-H2234.

Gomez IG, Tang J, Wilson CL, Yan W, Heinecke JW, Harlan JM, Raines EW. 2012. Metalloproteinase-mediated Shedding of Integrin  $\beta 2$  promotes macrophage efflux from inflammatory sites. *J Biol Chem* 287:4581-4589.

Gosens R, Grainge C. 2015. Bronchoconstriction and airway biology: Potential impact and therapeutic opportunities. *Chest* 147:798-803.

Gunsf SJ, Zhang W. 2008. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: A new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C576-C587.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvir CG, Gelfand EW. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775.

Heino J, Kapyla J. 2009. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des* 15:1309-1317.

Hynes RO. 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.

Kryczka J, Stasiak M, Dziki L, Mik M, Dziki A, Cierniewski C. 2012. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the  $\beta 1$  integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *J Biol Chem* 287:36556-36566.

Lecoeur H, Ledru E, Gougeon ML. 1998. A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J Immunol Methods* 217:11-26.

Liu J, He X, Qi Y, Tian X, Monkley SJ, Critchley DR, Corbett SA, Lowry SF, Graham AM, Li S. 2011. Talin1 regulates integrin turnover to promote embryonic epithelial morphogenesis. *Mol Cell Biol* 31:3366-3377.

Manuyakorn W. 2014. Airway remodelling in asthma: Role for mechanical forces. *Asia Pac Allergy* 4:19-24.

- Menon B, Krishnamurthy P, Kaverina E, Johnson JN, Ross RS, Singh M, Singh K. 2006. Expression of the cytoplasmic domain of beta1 integrin induces apoptosis in adult rat ventricular myocytes (ARVM) via the involvement of caspase-8 and mitochondrial death pathway. *Basic Res Cardiol* 101:485–493.
- Montanez E, Wickstrom SA, Altstatter J, Chu H, Fassler R. 2009. Alpha-parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling. *EMBO J* 28:3132–3144.
- Montes de Oca P, Malarde V, Proust R, Dautry-Varsat A, Gesbert F. 2010. Ectodomain shedding of interleukin-2 receptor beta and generation of an intracellular functional fragment. *J Biol Chem* 285:22050–22058.
- Moreno-Alvarez P, Sanchez-Guerrero E, Martinez-Cordero E, Hernandez-Pando R, Campos MG, Cetina L, Bazan-Perkins B. 2010. Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung* 188:97–105.
- Mulrooney JP, Hong T, Grabel LB. 2001. Serine 785 phosphorylation of the beta1 cytoplasmic domain modulates beta1A-integrin-dependent functions. *J Cell Sci* 114:2525–2533.
- Muranyi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haysstead TA, Walsh MP, Erdodi F, Kiss E, Wu Y, Hartshorne DJ. 2002. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J* 366:211–216.
- Papa V, Russo P, Gliozzo B, Goldfine ID, Vigneri R, Pezzino V. 1993. An intact and functional soluble form of the insulin receptor is secreted by cultured cells. *Endocrinology* 133:1369–1376.
- Popova SN, Lundgren-Akerlund E, Wiig H, Gullberg D. 2007. Physiology and pathology of collagen receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 190:179–187.
- Qian Y, Zhong X, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu C, Dedhar S, Shi X, Jiang BH. 2005. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 24:3154–3165.
- Ramos-Ramirez P, Campos MG, Martinez-Cordero E, Bazan-Perkins B, Garcia-Zepeda E. 2013. Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Exp Lung Res* 39:136–145.
- Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ. 1995. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: An immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 43:1061–1069.
- She S, Xu B, He M, Lan X, Wang Q. 2010. Nm23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migration on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. *J Exp Clin Cancer Res* 29:93.
- Teoh CM, Tam JK, Tran T. 2012. Integrin and GPCR Crosstalk in the Regulation of ASM Contraction Signaling in Asthma. *J Allergy (Cairo)* 2012:341282.
- Velasco G, Armstrong C, Morrice N, Frame S, Cohen P. 2002. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett* 527:101–104.
- Wehrle-Haller B. 2012. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 24:569–581.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. 2004. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692:103–119.
- Wu Y, Huang Y, Herring BP, Gunst SJ. 2008. Integrin-linked kinase regulates smooth muscle differentiation marker gene expression in airway tissue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L988–L997.
- Zhang W, Wu Y, Wu C, Gunst SJ. 2007. Integrin-linked kinase regulates N-WASP-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 282:34568–34580.
- Zheng M, Fang H, Hakomori S. 1994. Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* 269:12325–12331.
- Zong H, Bastie CC, Xu J, Fassler R, Campbell KP, Kuzland JJ, Pessin JE. 2009. Insulin resistance in striated muscle-specific integrin receptor beta1-deficient mice. *J Biol Chem* 284:4679–4688.