



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**Expresión de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
en un modelo de asma alérgica: correlación con la
magnitud de la hiperreactividad**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:

Fernando Ávila Carbajal



TUTOR:

Biólogo Germán Fernando Gutiérrez Aguilar

MÉXICO

2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Vocal: Dr. José Luis Arreola Ramírez

Secretario: Biól. Germán Fernando Gutiérrez Aguilar

1er. Suplente: M. en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez

2do. Suplente: M. en C. Luz María García Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema:



Este trabajo se realizó en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, de la Secretaría de Salud bajo la asesoría del Biólogo Germán Fernando Gutiérrez Aguilar y con el apoyo de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales mediante el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (Probei).

Agradecimientos.

- + A mi familia por su gran apoyo incondicional para mi desarrollo académico.**

- + A la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins por brindarme sus conocimientos para la realización de este trabajo.**

- + A mi tutor y amigo Germán Fernando Gutiérrez Aguilar por su gran apoyo y paciencia.**

- + A los miembros del comité Dr. José Luis Arreola Ramírez, M. en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez, M. en C. Luz María García Hernández.**

- + A todos aquellos compañeros que me acompañaron durante largas jornadas de trabajo en el laboratorio Pablo Hernández, Alicia Novelo, Mayra Dinorah, Karen Larios, Paulina Mecedillo y Guadalupe Córdoba.**

- + Gracias a Dios por poner a todas estas personas en mi camino y recibir este amor incondicional de mis padres y hermano.**

- + A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una gran educación y desarrollo personal.**

ÍNDICE

Contenido

Resumen	5
Abreviaturas	6
Introducción	7
Vías aéreas	7
Asma.....	8
Inflamación.....	10
Interleucina 13	11
Músculo liso de la vía aérea	12
Hiperreactividad.....	12
Contracción del músculo liso	14
Serca.....	15
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo	19
Materiales y métodos	20
Animales.....	20
Sensibilización	20
Pletismografía Barométria	20
Reactividad de las vías aéreas	23
Western Blot	24
Disgregación del músculo liso de las vías aéreas	24
Citometría de flujo	25
Análisis estadístico	25
Resultados	26
Reactividad de las vías aéreas.....	26
Expresión de SERCA en el MLVA mediante Western blot.....	27
Expresión de SERCA e IL-13 en miocitos mediante citometría.	27
Discusión	31
Conclusiones	33
Referencias	34

Resumen

El asma es una enfermedad en donde la inflamación, obstrucción reversible y contracción excesiva (hiperreactividad) del músculo liso de las vías aéreas son componentes fisiopatológicos constantes. Dicha contracción del músculo liso depende del ion calcio (Ca^{2+}) que es regulado fundamentalmente por la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés). Se ignora si la inflamación podría inducir alteraciones en la expresión de SERCA. Esta bomba es un importante modulador de la fisiología muscular, pues la disminución de su actividad, además de incrementar la magnitud de la contracción, puede inducir diferenciación celular, hipertrofia e hiperplasia muscular.

Nuestro objetivo fue determinar si la expresión de SERCA en miocitos traqueales se correlaciona con la magnitud de la hiperreactividad y la inflamación de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Resultados: A partir del primer reto, los cobayos presentaron broncoobstrucción transitoria, que al menos triplico el índice de broncoobstrucción (íB) basal e hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina. Estas alteraciones mantuvieron la misma magnitud hasta el duodécimo reto. El íB basal obtenido antes de los retos, fue incrementándose progresivamente hasta alcanzar significancia estadística desde el noveno reto ($P < 0.05$). La expresión de SERCA e IL-13 en los miocitos traqueales no presentaron modificaciones significativas con respecto al control. Sin embargo, la magnitud de la expresión de SERCA correlacionó directamente con la expresión de IL-13 en los miocitos (0.48, $P < 0.05$), y negativamente con la magnitud de la hiperreactividad a la histamina (0.50, $P < 0.05$) y la obstrucción basal (-0.66, $P < 0.05$). Con estos resultados concluimos que el incremento sostenido de los niveles de Ca^{2+} intracelular se debe probablemente a la baja expresión de SERCA, y que este mecanismo podría tener un papel importante en el aumento del tono y la reactividad de la vía aérea. Adicionalmente, es probable que la hiperreactividad se desarrolle en un fenotipo de músculo liso de la vía aérea no-sintético.

Abreviaturas

Ca ²⁺	-----	Ión Calcio
IP3	-----	Inositol 1,4,5-trifosfato
OVA	-----	Ovoalbúmina
SSF	-----	Solución salina fisiológica
íB	-----	Índice de broncoobstrucción
PD ₂₀₀	-----	Dosis provocativa 200
IL-13	-----	Interleucina 13
SERCA	-----	Bomba de Calcio del Retículo Sarcoplásmico
CO ₂	-----	Bióxido de Carbono
O ₂	-----	Oxígeno
IgE	-----	Inmunoglobulina E
PLCβ	-----	Fosfolipasa C
PIP2	-----	Fosfatidinositol 4,5 bifosfato
DAG	-----	Diacilglicerol
RS	-----	Retículo Sarcoplásmico
(Ca ²⁺) _i	-----	Concentraciones de calcio intracelular

Introducción.

Vías aéreas

La ventilación es el proceso por el cual un organismo obtiene oxígeno del medio, con el objetivo de abastecer sus necesidades metabólicas. Esto lo realizan a través del aparato respiratorio que está integrado por las vías aéreas y los pulmones (García & Carballo, 2007).

Se entienden como vías aéreas los conductos por donde entra y sale el aire del organismo, éstos son los encargados de conducir dicho aire inhalado hasta la zona de intercambio gaseoso, además de calentar, humidificar y filtrar, protegen al organismo contra partículas inhaladas. Estas características pueden ser realizadas gracias a un revestimiento de epitelio productor de moco, cilios y células del sistema inmune. (González & Suárez, 2008).

El aire inhalado entra en contacto primero con las vías aéreas superiores que constan de las fosas nasales, faringe, laringe y tráquea cervical. Las vías aéreas inferiores están constituidas por la tráquea, bronquios y bronquiolos en todas sus ramificaciones, hasta llegar a los alveolos pulmonares, los cuales tienen una función vital, que es intercambiar bióxido de carbono (CO₂) por oxígeno (O₂) (González & Suárez, 2008).

Los pulmones son sacos elásticos multicamerales que se encuentran recubiertos por capas membranosas llamadas pleura visceral y parietal que están formadas por las costillas y el diafragma. Durante la respiración normal, la caja torácica se expande y contrae mediante la acción de una serie de músculos esqueléticos: diafragma y músculos intercostales internos y externos, esto con la finalidad de movilizar el aire desde el ambiente hasta los alveolos pulmonares y viceversa. Las contracciones de estos músculos están determinadas por la actividad de motoneuronas controladas por el centro respiratorio ubicadas en el bulbo raquídeo, (Ganong, 2002).

Esta movilización debe vencer dos resistencias: la resistencia elástica del pulmón que se opone a la distensión y la resistencia de las vías aéreas que se opone al paso del aire (Vargas, 2009). El aumento de volumen torácico reduce la presión alveolar lo que induce que el aire penetre hasta llegar a los 300 millones de alvéolos que representan la porción respiratoria pulmonar, es aquí donde se realiza el intercambio gaseoso (Ganong, 2002). Los alvéolos son sacos interconectados y cerrados por un extremo, la superficie total de contacto que el pulmón mantiene con el medio exterior es aproximadamente de 85 m² (González & Suárez, 2008).

Cuando las vías aéreas están expuestas a contaminantes en el aire como son el tabaco, ozono o aún a alérgenos, se incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias como el asma. En particular, el asma es una de las enfermedades respiratorias más comunes en la población, en general y se sabe que factores como la obesidad, la disminución de ejercicio, los cambios en la dieta son posibles contribuyentes al aumento de la incidencia en esta enfermedad (Selgrade et al., 2006).

El asma es un problema mundial que afecta a aproximadamente a 300 millones de (GINA, 2009). En nuestro país mediante cuestionarios estandarizados aplicados en varias escuelas de ciudades mexicanas, se observó una prevalencia de asma del 4,5% y 12,6% en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Durante el 2006 se realizaron 600,000 consultas por asma, además de proporcionar atención hospitalaria a casi 270,000 casos de exacerbaciones por esta enfermedad (IMSS, 2010).

Asma

El asma es un trastorno de las vías aéreas donde la alteración funcional básica es la obstrucción del flujo aéreo, causada por la disminución del calibre en especial cuando se realiza la espiración (Vargas, 2009). En el asma participan diversas células y elementos celulares que se caracterizan por inflamación, obstrucción y una gran reactividad (hiperreactividad) de las vías aéreas, teniendo como resultado una enfermedad compleja, heterogénea y variable (Kim, DeKruyff, & Umetsu, 2010). Fisiopatológicamente el asma se caracteriza por episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, principalmente por las noches o durante las primeras horas de la mañana. Este tipo de eventos están asociados a la obstrucción generalizada pero variable en el flujo aéreo, esta es reversible con tratamiento o de manera espontánea (GINA, 2009).

Existen diversos factores que hacen susceptible a un individuo a desarrollar asma, como son genéticos y ambientales sin embargo la edad, dieta, sexo y estilo de vida del individuo pueden estar contenidos en esta tendencia al desarrollo de la enfermedad (Selgrade et al., 2006). A pesar de tener importantes componentes genéticos y ambientales, la patogénesis del asma no es clara, su definición es descriptiva. En consecuencia y al no tener una definición esclarecida del fenotipo de asma existe una inclinación hacia las características que son medidas como la atopia e hiperreactividad (GINA, 2009).

La atopia se entiende como la predisposición hereditaria a producir cantidades excesivas de inmunoglobulina E (IgE) específica. El individuo atópico es aquel que presenta altos niveles de IgE, específica para alérgenos. Sin embargo esta predisposición genética no está claramente descrita hasta ahora, ya que no se sabe del todo la función de los genes asociados con el asma (González & Suárez, 2008).

Otra de las características constantes en el asma es la inflamación, la cual está determinada por la participación de un gran número de células inflamatorias como los linfocitos T, células del complejo mayor de histocompatibilidad clase II presentes en los linfocitos B, entre otras células presentadoras de antígenos. Todo esto depende de la forma y el sitio de ingreso del alérgeno, lo cual puede ser por inhalación, ingestión, inyección o a través de la piel (García & Carballo, 2007) estos múltiples mediadores darán lugar a características fisiopatológicas (GINA, 2009).

El factor causante más conocido para el desarrollo de este trastorno es la exposición a alérgenos en individuos que presentan atopia, aunque las infecciones virales, humo de tabaco, dieta, sensibilizadores ocupacionales y la contaminación también pueden contribuir a la generación del asma (Selgrade et al., 2006). Se podría definir la palabra alergia como una respuesta alterada del sistema inmune ante este tipo de exposición a alérgenos. Por esta razón se conoce al asma alérgica como extrínseca (González & Suárez, 2008).

Una de las causas mayor conocidas para provocar la instalación de un cuadro asmático en sujetos atópicos, es la exposición a alérgenos, aunado a una gran susceptibilidad para el establecimiento y expresión de esta enfermedad. Este montaje y episodios de asma pueden ser causados por muchos factores como exposición a alérgenos, contaminantes o virus, cada uno de estos puede inducir a una respuesta inflamatoria (Bousquet et al., 2000). Sin embargo muchos son los casos donde esta reacción no está relacionada con alérgenos, sino con el desarrollo de una sensibilidad a ácido acetilsalicílico, poliposis nasal y dependencia a esteroides (García & Carballo, 2007). Este tipo de asma no alérgica es también conocida como intrínseca. El asma intrínseca es menos frecuente que la extrínseca y salvo por la presencia de atopia es clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similar al asma alérgica (González & Suárez, 2008).

Cuando el individuo sensibilizado se expone al alérgeno presenta un bronco espasmo, el cual es una obstrucción que se atribuye a la contracción del músculo liso, además aumenta la síntesis de moco, ocasionando un taponeo de la vía aérea y un engrosamiento de la pared traqueal dado por la inflamación. La inflamación está caracterizada por un predominio de

eosinófilos, además de la participación de células T, neutrófilos, mastocitos, células cebadas, etc. (Vargas, 2009).

La inflamación se presenta como una respuesta natural del organismo ante algún patógeno, los tipos celulares que intervienen en esta reacción juegan un papel importante en la expresión de esta enfermedad, esta se inicia cuando un estímulo físico o químico produce episodios, crisis o exacerbaciones que se manifiestan con síntomas respiratorios. Las exacerbaciones pueden ser producidas por alérgenos en el asma extrínseca y por no alérgicos en el asma intrínseca (González & Suárez, 2008).

Inflamación

El asma es una enfermedad inflamatoria acompañada de importantes cambios anormales sobre el tejido de la vía aérea como hiperplasia de las glándulas submucosas, neovascularización, fibrosis subepitelial, e hipertrofia del músculo liso. Estas son características consistentes en el cambio de la arquitectura de la vía aérea. Este proceso es conocido como remodelación (Mahn, 2009).

La inflamación es reconocida como un componente clave dentro de la patología del asma, lo cual nos ha llevado a poner atención en la heterogeneidad de la composición celular liberada en esta enfermedad. Teniendo tres tipos celulares predominantes eosinófilos, neutrófilos y granulocitos (King & Moores, 2008).

El proceso inflamatorio es un mecanismo vascular y celular en donde el tejido responde ante una agresión o lesión, para que este tipo de respuesta se desarrolle es necesario algún tipo de estímulo inflamatorio, que en la mayoría de los casos es beneficioso para el huésped. Este proceso tiene como finalidad controlar y erradicar el agente infeccioso mediante el reclutamiento de elementos celulares del sistema inmunitario, evitando la diseminación del agente más allá del sitio infectado, mediante la cascada de inflamación (Abbas et al., 2008).

Este proceso alérgico inicia cuando un alérgeno es endocitado y presentado por macrófagos o células dendríticas a los linfocitos T inmaduros, estos maduran y tienen una interacción con los linfocitos B para producir el anticuerpo IgE que es específico para el alérgeno. Cuando este anticuerpo se une a su receptor de alta afinidad FcεRI el cual está

expresado en la membrana de mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos y otras células se dice que el individuo se encuentra sensibilizado (García & Carballo, 2007).

Sin embargo la expresión del asma se da posteriormente a este suceso al existir un segundo contacto del antígeno con la célula sensibilizada y este es reconocido. Este tipo de alérgenos son procesados como cualquier otro y presentados a los linfocitos Th2; los cuales abundan en este tipo de respuesta. El contacto subsecuente con el alérgeno desencadena varias vías de transmisión de señales dentro de la célula, que inducen una desgranulación de los mediadores de las células cebadas como histamina, factor activador de plaquetas, leucotrienos y prostaglandinas en mastocitos y basófilos sensibilizados. Lo anterior caracteriza tanto el asma extrínseca como el asma intrínseca. Por lo tanto la inflamación es uno de los elementos más importantes en la fisiopatología del asma presentándose una eosinofilia y un importante incremento en la población de linfocitos Th2 (García & Carballo, 2007).

Los linfocitos th2 tienen la capacidad de secretar distintos tipos de mediadores inflamatorios, entre ellos se encuentran las interleucinas, específicamente la interleucina 13 (IL-13) e interleucina 4 (IL-4). Abundante evidencia ha demostrado que la IL-13 dirige muchos de los procesos que intervienen en la respuesta del asma alérgica como la síntesis de IgE (Ingram & Kraft, 2012). La IL-13 es un contribuyente importante en el desarrollo de la respuesta alérgica, su inhibición se puede considerar como una aplicación terapéutica importante en la prevención de la obstrucción nasal persistente en el asma, se ha observado que en ausencia de esta interleucina, ratones fueron incapaces de producir células calciformes, responsables de la producción en exceso de moco en el asma, además de no poder recuperar los niveles básicos de IgE (Shazia et al., 2003)

Interleucina 13

La IL-13 juega un papel importante dentro del proceso inflamatorio debido a que su liberación en las vías aéreas promueve la supervivencia y migración de eosinófilos, activación de macrófagos, incremento en la permeabilidad, producción de moco y óxido nítrico por las células epiteliales de la vía aérea y transformación de fibroblasto a miofibroblasto, que conducen a la deposición de colágeno, también estimula la hiperreactividad de las vías aéreas y síntesis de IgE (Grunstein et al., 2002; Ingram & Kraft, 2012). Sin embargo muchas otras células están implicadas en la participación de la respuesta alérgica, lo que nos podría proporcionar diferentes fenotipos de esta enfermedad (Ingram & Kraft, 2012).

De acuerdo con el tipo celular, la IL-13 tiene diferentes efectos. Por ejemplo, mientras se le ha dado un papel importante en la inflamación, también se reconoce que puede inhibir la producción de mediadores proinflamatorios en miocitos y macrófagos (Gurjit & Khurana, 2003).

Existe evidencia en donde se observa que los cambios en la estructura de la vía aérea o remodelación de la misma se deben probablemente al proceso de inflamación. Existen hipótesis donde se menciona que la remodelación de las vías aéreas, es un componente central en el desarrollo de la obstrucción del musculo liso (Ward et al., 2002) teniendo como consecuencia una obstrucción del flujo aéreo, siendo esta la alteración funcional básica dentro del asma (Vargas, 2009).

Músculo liso de la vía aérea

La obstrucción del flujo aéreo en las vías aéreas se puede presentar de manera episódica, crisis o exacerbación asmática. Esta obstrucción es consecuencia de una disminución en el calibre del musculo liso de la vía aérea principalmente durante la espiración (Vargas, 2009).

La broncoobstrucción está caracterizada por contracción de musculo liso (broncoespasmo) aunado a una liberación de mediadores, reduciendo así el calibre de la vía aérea, principalmente en bronquiolos. Además de la contracción, están presentes características constantes en este trastorno como la inflamación y la remodelación ocasionados por edema, hiperplasia de las glándulas submucosas, neovascularización y fibrosis epitelial, y engrosamiento de la pared (Vargas, 2009).

Hiperreactividad

La respuesta alérgica está sumamente relacionada con la hiperreactividad de la vía aérea, podemos considerar la palabra alergia como una respuesta alterada ante un estímulo subsecuente. Dentro de esta patología se presenta el asma extrínseca e intrínseca (García & Carballo, 2007).

La sensibilidad de las vías aéreas la conocemos como un lapso en el cual el espacio de la luz de la vía se reduce después de una exposición a un agonista contráctil. Así la hiperreactividad es el incremento en la habilidad de desarrollar esta respuesta. La hiperreactividad de las vías aéreas consiste en un incremento en la sensibilidad con una contracción más fácil y rápida de la vía aérea, hacia un agonista contráctil (O'Byrne & Inman, 2003).

La hiperreactividad puede ser provocada por estímulos directos o indirectos. Conocemos como estímulos directos aquellos agonistas contráctiles que actúan directamente sobre los receptores del músculo liso de la vía aérea, provocando una broncoobstrucción, como son metacolina e histamina entre otros. Por otro lado tenemos los métodos indirectos, que pueden ser desencadenados por, adenosina ejercicio, hiperventilación con aire frío o aire seco; estos actúan a través de una o más vías de señalización intermedias liberando mediadores contráctiles provenientes de las células inflamatorias presentes en la vía aérea (Cockcroft, 2010) y al igual que los estímulos directos provocan una broncoobstrucción.

La hiperreactividad puede ser determinada mediante la administración de agonistas que estimulan la contracción del músculo liso de las vías aéreas; al evaluarla con una curva de dosis-respuesta. Sin embargo, hoy en día los procesos involucrados en el desarrollo de la hiperreactividad no son del todo claros (Cockcroft & Davis, 2006). Sin embargo se ha demostrado que al inhalar histamina o metacolina se provoca un proceso de broncoobstrucción el cual es el causante del cierre de la luz en la vía aérea (Grootendorst & Rabe, 2004). Generalmente el grado de hiperreactividad está relacionado con la severidad en el asma, en donde a una menor dosis de histamina o metacolina el individuo reacciona de una forma más agresiva. Esto se ha evaluado con la caída del volumen respiratorio forzado al primer segundo (FEV1) como se muestra en la figura 1 (Cockcroft & Davis, 2006).

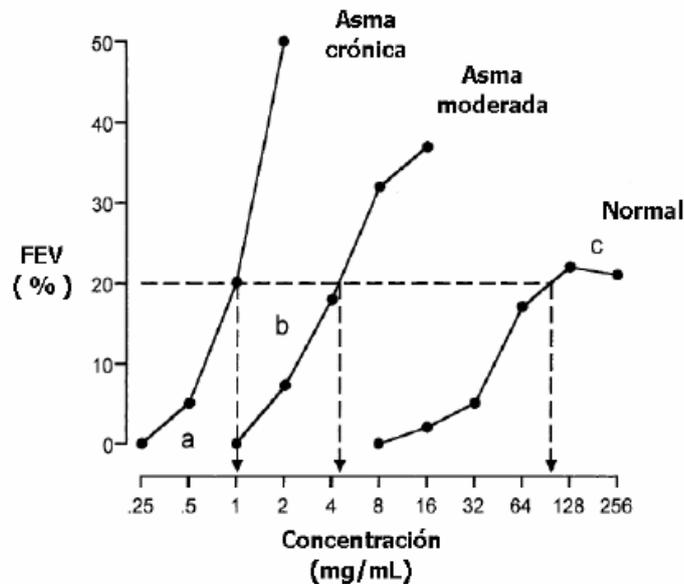


Fig. 1. Severidad del asma en relación con el grado de hiperreactividad. Se observa una curva dosis-respuesta con la caída del volumen respiratorio forzado al primer segundo (FEV1) a diferentes concentraciones de agonista contráctil (O'Byrne & Inman, 2003).

Se conocen varios mecanismos por los cuales se hace presente la hiperreactividad, el incremento en el número de eosinófilos es uno de ellos, teniendo como resultado cambios en la estructura del tejido, el cual incluye daño epitelial, engrosamiento de la membrana basal, la liberación de mediadores con capacidad de provocar contracción del músculo liso bronquial, provocado por el engrosamiento de la pared de la vía y remodelación de la misma (O'Byrne & Inman, 2003).

Existen dos factores principales dentro del desarrollo de la hiperreactividad, el primero es la reacción en la fase temprana, la cual es iniciada y caracterizada por la activación de mastocitos y basófilos liberando mediadores proinflamatorios. El segundo factor es la hiperreactividad persistente la cual está asociada a cambios en la arquitectura de la vía aérea inducidos por la inflamación crónica. A este cambio estructural se le conoce como remodelación de las vías aéreas (Cockcroft & Davis, 2006).

Contracción del músculo liso

La remodelación del músculo liso confiere a este un papel central en los aspectos clínicos y fisiopatológicos en el desarrollo del asma como son una reversible obstrucción de las vías aéreas, hiperreactividad bronquial dada por estímulos directos e indirectos, inflamación crónica y cambios estructurales (Pelaia et al., 2008).

Al igual que los demás fenómenos de contracción, la contracción del músculo liso de las vías aéreas depende de los iones de Ca^{2+} , el cual debe tener una precisa regulación dentro de estas vías de señalización ya que este contribuye a una larga lista de funciones esenciales dentro de la célula y en el caso particular del asma a la contracción del músculo liso de la vía aérea (Brini & Carafoli, 2009).

La contracción del músculo liso se da por medio de una cascada de señalización; la cual comienza con la interacción del agonista contráctil con receptores acoplados a proteínas G, los que conducen a la activación de la fosfolipasa C ($\text{PLC}\beta$); esta hidroliza al fosfatidinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) produciendo dos nuevos mensajeros, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une con su receptor en el retículo sarcoplásmico (RS) y así libera Ca^{2+} ; este se une a la calmodulina para formar el complejo Ca^{2+} -calmodulina-cinasa de la cadena ligera de la miosina, el cual permite la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en la serina 19, dando como resultado la activación de la adenosintrifosfatasa de miosina, lo que facilita la interacción de los filamentos de actina y miosina, permitiendo la contracción del músculo liso de las vías aéreas. Este proceso es terminado mediante la desforforilación de la miosina, desactivando la cinasa de la cadena ligera de miosina y en consecuencia el músculo se relaja (Gunts & Wenwu, 2008).

La respuesta del músculo liso de la vía aérea hacia diversos estímulos está controlada por cambios en la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol. La proteína SERCA es una de las principales bombas reguladora de Ca^{2+} en el músculo liso recapturando el Ca^{2+} libre en el citosol dentro del RS (Mahn et al., 2009).

Serca

Las concentraciones de calcio intracelular (Ca^{2+})_i en las células del músculo liso de las vías aéreas tienen un primordial rol en la excitación y contracción del mismo. Se han descrito dos formas por medio de las cuales el (Ca^{2+})_i se incrementa. Una es por medio del flujo a través de la membrana dado por receptores operacionales sensibles a voltaje y el otro mecanismo requiere la liberación intracelular de Ca^{2+} proveniente principalmente del RS, por medio de la vía IP_3 (Bazán et al., 2003).

La proteína SERCA tiene un papel fundamental en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana del RS pesa alrededor de 110 kDa y es reconocida como uno de los principales sistemas de control de Ca^{2+} citoplasmático en las células del músculo liso (Mahn, et al., 2009).

Esta habilidad de remover Ca^{2+} del citosol induce una relajación del mismo (Brini & Carafoli, 2009).

Esta proteína está situada sobre la membrana del RS, expresando cuatro principales dominios, el dominio transmembranal también conocido como dominio M, el cual cuenta con 10 hélices transmembranales (M1-M10), y tres dominios citosólicos, dos de ellos (dominio A y P) están conectados con el dominio M. Por último el dominio N, está conectado con el dominio P (Fig. 2) (Carafoli & Brini, 2009).

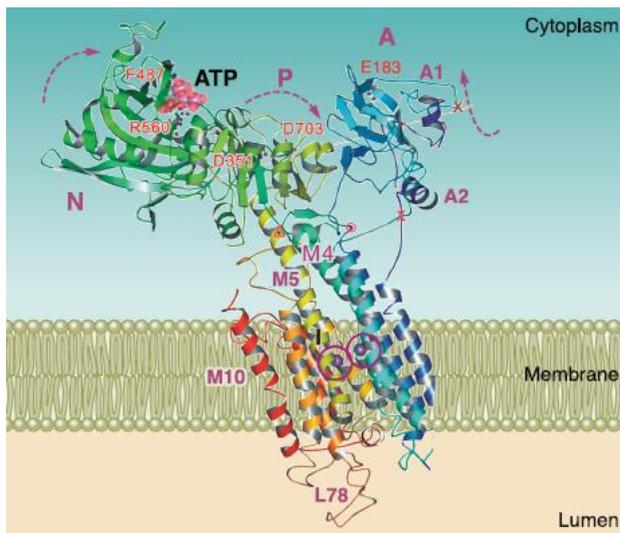


Fig. 2. Disposición de dominios de la bomba de Ca^{2+} SERCA. Sobre la membrana del retículo sarcoplásmico se observan los distintos dominios de la proteína: M, A, P y N.

Durante la unión a Ca^{2+} y transporte del mismo, esta proteína presenta cambios conformacionales sobre su estructura, en los cuales se cambia de la conformación “compacta” hacia una estructura más “abierta”. SERCA presenta dos estados (E1 y E2) estos son característicos por tener una alta y una baja afinidad por el Ca^{2+} respectivamente (Fig. 3).

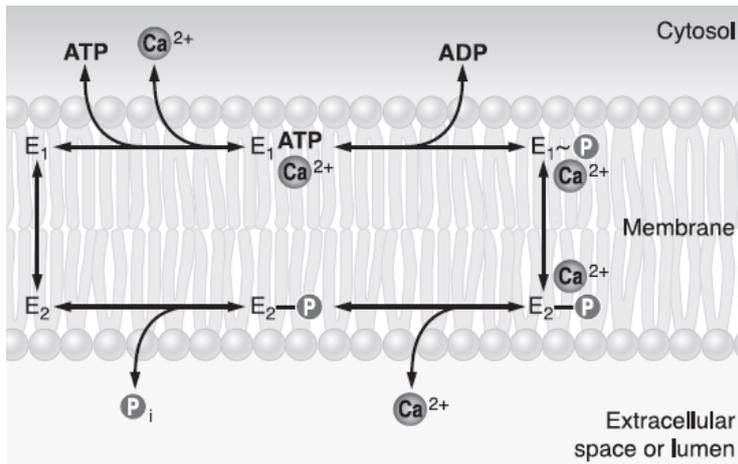


Fig. 3. Estados de afinidad de SERCA. Se observa los diferentes estados de alta afinidad (E1) y baja afinidad (E2) hacia Ca^{2+} de la proteína SERCA donde la unión de ATP, disociación del mismo en ADP y la unión de un grupo fosfato serán los responsables del tránsito de Ca^{2+} a través de la proteína. Este tránsito culmina con la liberación de Ca^{2+} hacia el RS. (Modificado de Carafoli & Brini, 2009).

Como se muestra en la figura 4A la proteína al unirse con el Ca^{2+} presenta un enderezamiento en el dominio M5 perdiendo la forma compacta permitiendo así la unión de ATP, esto ocasiona una inclinación del dominio N y teniendo como consecuencia una separación del dominio P y A. Como podemos ver en el apartado B de la misma figura el ATP se une entrecruzando los dominios P y N provocando el contacto entre el dominio P y el dominio A.

Posteriormente el dominio A presenta una serie de cambios conformacionales, primero tirando hacia arriba y doblando la hélice 1 del dominio M, durante este proceso se obtiene la liberación de ADP, para esto es necesario que se lleve a cabo el proceso conocido como hidrólisis del ATP provocando la apertura de los dominios N y P. Posterior a esto se da una nueva rotación del mismo dominio reorganizando las hélices M1 a M6 ocasionando la liberación de Ca^{2+} dentro del RS y bloqueando la salida del mismo al citosol (Fig. 4C).

La unión con otro ion de Ca^{2+} proveniente del citosol volverá a enderezar el dominio M en la hélice 5 y comenzará el ciclo de recaptura de Ca^{2+} nuevamente (Fig. 4D).

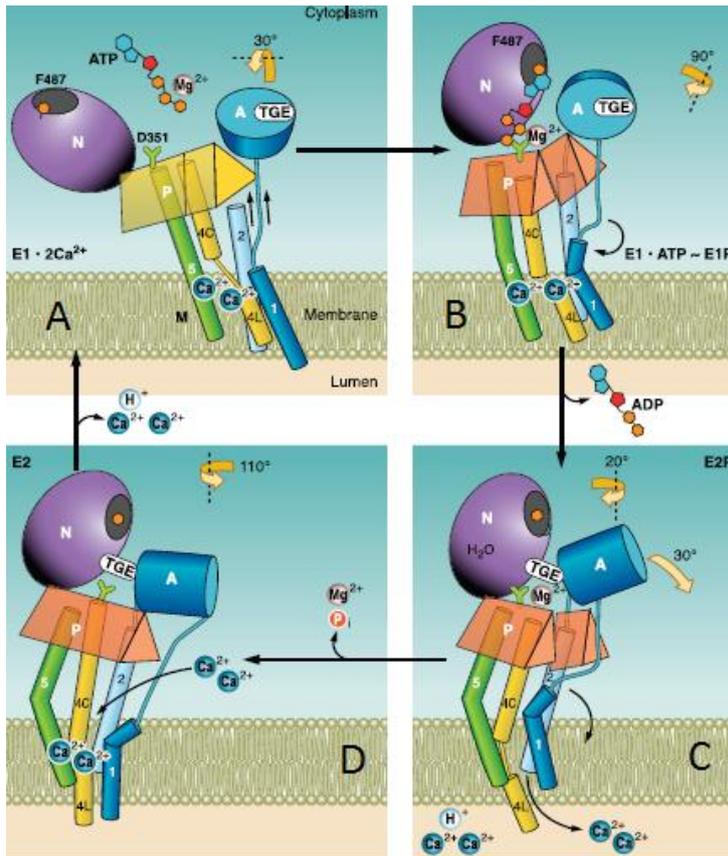


Fig. 4. Esquema de los cambios conformacionales de SERCA. Los ciclos de reacción culmina con el tránsito de Ca^{2+} a través de la proteína lo que recaptura Ca^{2+} dentro del RS. (Modificado de Carafoli & Brini, 2009).

Se han encontrado 3 distintas isoformas de esta proteína en los mamíferos, SERCA1, SERCA2 Y SERCA3 cada una de ellas está adaptada a funciones específicas. Dentro del musculo liso de las vías aéreas SERCA2 tiene una mayor expresión y la isoforma SERCA2b es predominante. Las otras isoformas se encuentran por debajo del nivel de detección. Se sabe que una disminución en la captura de Ca^{2+} podría impactar en un amplio rango de funciones del musculo liso de la vía aérea (Mahn, 2009), teniendo una importante determinación en la hiperreactividad de las vías aéreas, la cual es una característica fundamental en el asma.

Justificación

El asma es una de las enfermedades crónicas tratables más comunes a nivel mundial. La prevalencia de la enfermedad en México es del 2.5 al 5%, y se estima que suceden 14.5 muertes por cada 100,000 asmáticos (Global Burden Report, 2005). Una de las características constantes en el asma es el desarrollo de hiperreactividad. La contracción del músculo liso juega un rol central en el desarrollo de la hiperreactividad. Se sabe que un regulador importante de la contracción muscular es el Ca^{2+} intracelular. Los niveles intracelulares de éste ion son regulados por una gran cantidad de proteínas, pero en particular se sabe que SERCA contribuye a ésta regulación de manera importante; no obstante, poco se sabe sobre la relación entre la expresión de SERCA en el músculo liso de las vías aéreas y la hiperreactividad.

Hipótesis

La disminución de la expresión de SERCA puede estar asociada con el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Objetivo

Determinar si la expresión de SERCA en miocitos traqueales se relaciona con la magnitud de la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en el cobayo.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados de 350 a 450 g los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones de humedad, temperatura y alimentación dentro del bioterio del INER con ciclos de 12/12 luz y oscuridad, aire filtrado a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-70 % humedad y cama esterilizada. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el comité Ético y científico del INER (Número de proyecto B27-08).

Sensibilización

Durante el primer día se preparó una solución con ovoalbúmina (OVA; 0.06 mg/ml, Sigma St Louis, EU) e hidróxido de aluminio como adyuvante (1mg/ml; J:T Baker,NJ, EU) disueltos en 20 ml de solución salina fisiológica (SSF) y posteriormente se les inyectó 1 ml a los cobayos vía sistémica (subdérmica e intraperitoneal). A los 7 cobayos controles solamente se les inyectó SSF en las mismas cantidades (Figura 5).

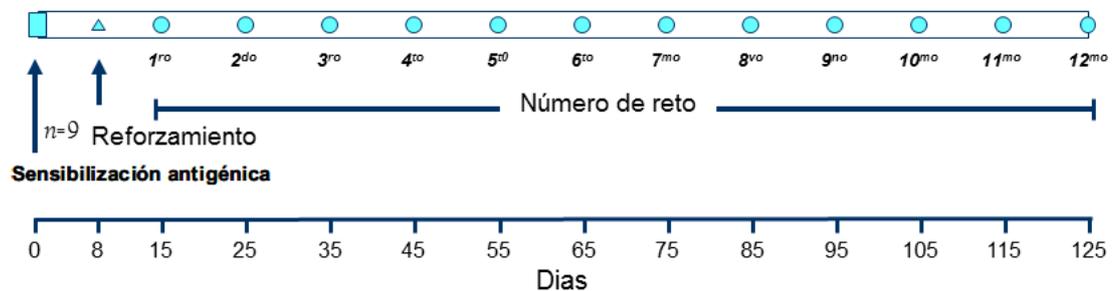


Fig. 5. Esquema de la sensibilización y administración los restos antigénicos en el modelo de asma alérgica. Se puede observar la sensibilización, así como su refuerzo y posteriores retos antigénicos a los que fueron sometidos los cobayos.

Pletismografía Barométrica

Ocho días después de la sensibilización se aplicó un refuerzo antigénico, en donde se colocaron a los cobayos dentro de una cámara de libre movimiento para aplicarles OVA y registrar el \dot{V}_B basal con la ayuda de un pletismógrafo barométrico para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, Ny, USA).

Posteriormente se les administro aerosoles de OVA (10mg/20ml 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 4µm de diámetro el 38% de 4 a 10µm y el 18% mayor a 10 µm. La cámara fue provista de flujo de aire continuo (10ml/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 está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia (Bazan-Perkins, 2004). 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 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 periodo fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. Cada valor \dot{V}_B fue el promedio de 15 s de lecturas y, de estas, el promedio de los últimos 5 min de cada período (Fig. 6).

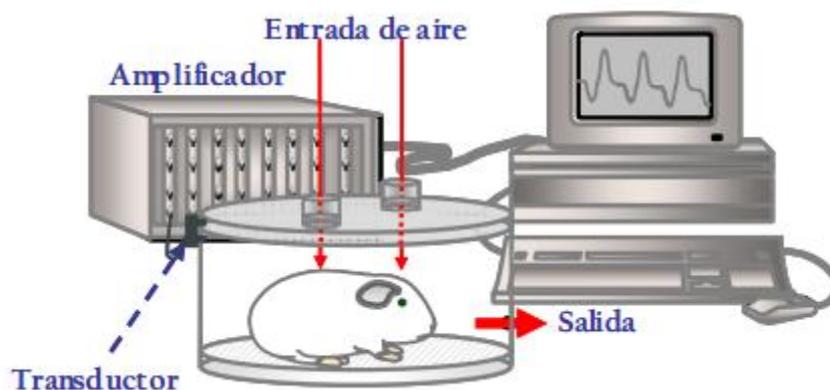


Fig. 6. Representación del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. En la figura se ejemplifica a un cobayo dentro de una cámara de pletismografía barométrica. Para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara, se utiliza un transductor de presión diferencial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

El \dot{V}_B 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 entra y se calienta de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ a 37°C una

vez que está dentro de los pulmones, además de que 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 la expiración en el equipo previamente calibrado (Fig.6.) (Hamelmann et al, 1997). La información es procesada para dar el valor del \dot{V}_B que es obtenido con la siguiente fórmula:

$$\dot{V}_B = \{(T_e - T_r) / T_r\} \{PFE / PFI\}$$

donde:

T_e = tiempo total espiratorio (s)

T_r = tiempo total de relajación (s)

PFI = Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH_2O)

PFE = pico de flujo espiratorio (presión positiva máxima, cmH_2O)

De los días 15 al 125 se realizaron 12 retos antigénicos, el día 15 se administró una solución de 20mg/ml de OVA en SSF. Los días restantes se administró una solución de 10mg de OVA disuelto en 20 ml de SSF. Todos los retos duraron un minuto y el \dot{V}_B fue registrado durante una hora. Los cobayos control solo recibieron SSF durante los retos.

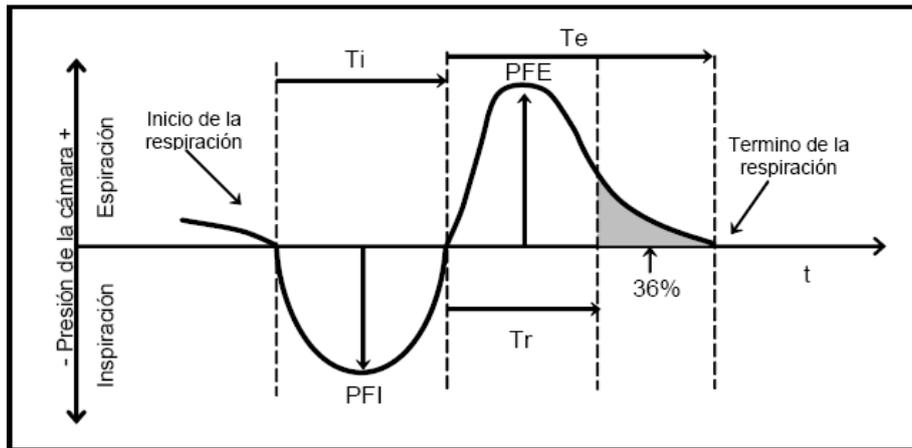


Fig. 7. Esquema del ciclo de respiración obtenido al medir cambios de presión dados por la inspiración y espiración de los animales dentro de la cámara de pletismografía barométrica. El ciclo comienza con el tiempo inspiratorio (Ti) y termina hasta finalizar esta. El tiempo total espiratorio (Te) es el intervalo subsecuente al finalizar la inspiración y termina hasta el inicio de una nueva. El Tr es el tiempo que transcurre desde que inicio la espiración hasta que el volumen corriente caiga un 36%. El pico máximo espiratorio (PFE) al igual que el pico máximo inspiratorio (PFI) se obtiene midiendo la presión positivas y negativas máximas registradas en un ciclo respiratorio. T: tiempo (s). Modificado de Hamelmann et al, 1997.

Reactividad de las vías aéreas

La reactividad de las vías aéreas fue evaluada en los grupos controles y en el grupo experimental al doceavo reto con OVA (día 125) comparando las curvas dosis respuesta a la histamina antes y después de la administración de OVA. Para ello, inicialmente se obtuvo el \dot{V}_B basal y posteriormente se nebulizaron dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml; Sigma St Louis, EU) durante 1 min. para cada dosis se registró el \dot{V}_B 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 \dot{V}_B basal dosis provocativa 200 (PD_{200}). Posteriormente se esperó a que la broncoobstrucción disminuyera a un \dot{V}_B aproximado al 50% del valor basal (Bazan-Perkins, 2004) y se retó con aerosoles de OVA 80.5 mg/mL SSF, 1min.

La segunda curva de histamina se realizó tres horas después de la administración de OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva.

Tras veinticuatro horas de terminada la curva de histamina, se efectuó la eutanasia de los cobayos mediante una sobredosis con pentobarbital sódico (20mg/kg) para provocar un paro cardiorrespiratorio. Posterior a esto se realizó una incisión sobre la tráquea para extraerla y obtener el músculo liso de la vía aérea.

Western Blot

La tira de músculo extraída fue puesta en un sonicador y posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas, con el reactivo de Bradford. 5 microgramos de proteínas se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 10% y después fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen USA). Estas membranas fueron bloqueadas con leche en polvo al 3% en TBS tween 1x (0.1M Tris, 0.5m NaCl y 1% tween 20) durante 3 horas a temperatura ambiente, después de esto, las membranas fueron lavadas 3 veces por 15 minutos con TBS tween al 1% e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario para SERCA (SERCA2 ATPase, Enzo Life sciences, USA).

Las membranas se lavaron una vez más con TBS tween 1x y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a temperatura ambiente. Nuevamente se aplicaron 3 lavados por 15 minutos a la membrana con TBS tween y en ausencia de luz se incubó con un sustrato quimioluminiscente (Pierce, USA). Posterior a esto la membrana se expuso a una placa CL-Xposure (Pierce, USA) y fueron reveladas.

Disgregación del músculo liso de las vías aéreas

Las células de músculo liso de las vías aéreas fueron disgregadas de la tráquea de los cobayos. Para esto, una vez disecada la tráquea, se eliminó la fascia superficial para seccionar la tráquea dorsalmente a lo largo de su eje. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se quitaron las capas de mucosa, serosa y vasos sanguíneos hasta obtener una tira de músculo liso. Esta tira fue colocada de 5 ml de solución Hank's (Gibco, New York, EUA) que contenía 2 mg de cisteína y 0.05 U/ml de papaína para incubarse en esta solución durante 10 min a 37°C. Posteriormente el tejido fue lavado con una solución de Leibovitz (Gibco, New York, EUA) para remover el exceso de enzima y después se colocó en solución de Krebs (composición (mM): 118 de NaCl, 25 de NaHCO₃, 4.6 de KCl, 1.2 de KH₂PO₄, 1.2 de MgSO₄ y 11 de glucosa, todos de Sigma, USA) que contenía 100 µl de Liberasa (Roche, EUA). En esta solución se llevó a cabo una segunda incubación durante 10 min a 37°C, hasta que las células se observaron disgregadas mediante agitación mecánica. Se corroboró la disgregación mediante la obtención de alícuotas que se observaron en microscopio. Una vez disgregadas las células, toda actividad enzimática fue detenida completamente adicionando solución de Leibovitz (Gibco, New York, EUA). Posteriormente las células disgregadas fueron concentradas mediante centrifugación a 600 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante conteniendo las enzimas, y este procedimiento se repitió una vez más.

Citometría de flujo

Las células del músculo liso de la vía aérea se incubaron por cuatro horas a 37°C en baño maría en 1 ml de RPMI (Gibco, EUA) y 4 µl de brefeldina A (Sigma, EUA) por cada millón de células para los grupos controles y 1ml de RPMI (Gibco, EUA), 4 µl de brefeldina A (Sigma, EUA), 10 µl de forbol 12-miristato,13-acetato y 5 µl de ionomicina (Sigma, EUA) por cada millón de células para los grupos experimentales. Posteriormente se permeabilizó la membrana con 1.5 ml de saponina (Sigma, EUA) 0.1%, albúmina sérica de bovino (Sigma, EUA) 10%, HEPES (Sigma, EUA) 0.01M y 100µg/µl de IgG de cerdo disuelto en 100 ml de PBS por 10 min agitando suavemente a temperatura ambiente. Después se incubaron las células con anticuerpos primarios contra SERCA-2 (Biomol, EUA) e IL-13 (BD Biosciences Pharmingen, EUA) ambas con 1 µl por 1×10^6 células y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se lavaron las células con 1.5 ml de solución saponina, y 0.1%, HEPES 0.1M disuelto en 300 ml de PBS. Se incubó durante 30 min a las células con los anticuerpos secundarios FITC mouse 1 µl (BD Biosciences Pharmingen, EUA) y PE mouse 1 µl (BD Biosciences Pharmingen, EUA) en las condiciones antes mencionadas. Se lavaron de nuevo con 1.5 ml de solución saponina 0.1%, HEPES 0.1M disuelto en 300 ml de PBS y por último se analizó en el citómetro de flujo (Becton & Dickinson FACScan model Scallibur, USA).

Análisis estadístico

La reactividad de la vía aérea a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% (DP_{200}), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el íB basal. Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si tenían una distribución normal y los valores descriptivos de las variables fueron expresados en la gráfica y tablas como la media \pm el error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se evaluaron con una prueba no pareada de *t* de Student. Se utilizó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para evaluar el íB basal. Las correlaciones se hicieron mediante la prueba de Pearson. En todos los casos las significancias se establecieron con una $p < 0.05$.

Resultados

Reactividad de las vías aéreas

La PD_{200} de histamina para los animales controles no fue diferente después de aplicarles el reto con OVA. La relación PD_{200} basal/ PD_{200} post-reto, que representa el grado de reactividad de las vías aéreas, fue cercana a 1 para los animales controles; mientras que para los cobayos sensibilizados (modelo de asma) exhibieron una PD_{200} post-reto hacia OVA menor al PD_{200} basal. Por este motivo el grado de reactividad del grupo del modelo de asma fue mayor (hiperreactividad) y significativamente diferente al grupo control ($P=0.05$, $n=7$; Fig. 8).

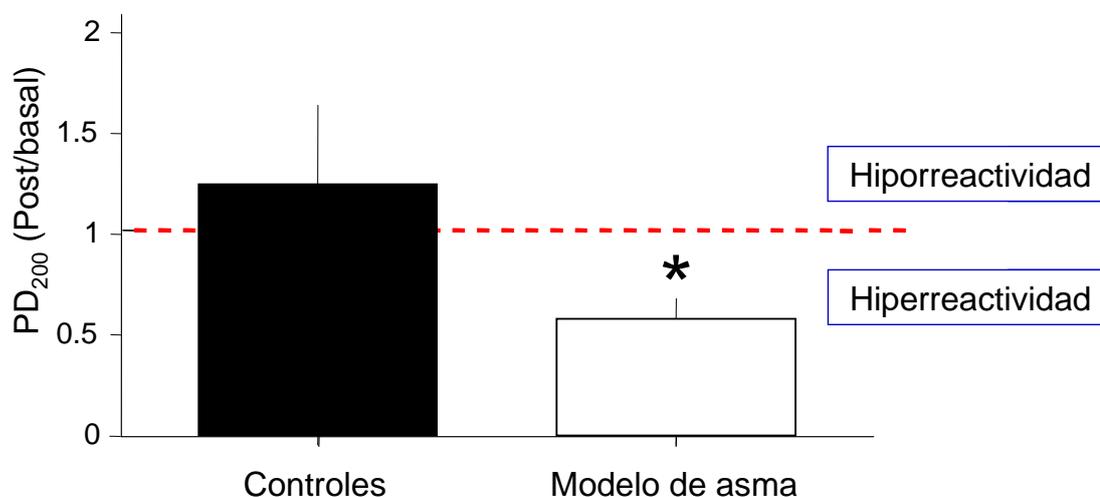


Fig. 8. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en un modelo de asma alérgica en cobayo. Se muestran las dosis de histamina requeridas para producir el 200% en el índice de obstrucción basal (PD_{200}). La línea punteada representa la frontera entre al hiperreactividad y la hiporreactividad. El coeficiente de reactividad se obtuvo al dividir la PD_{200} post/ PD_{200} basal, si tenemos un valor cercano a 1 significa que no existe la presencia de hiperreactividad a histamina (controles, $n=7$) y cuando el coeficiente es menor tenemos la presencia de hiperreactividad (modelo de asma, $n=7$). * $p<0.05$, prueba no pareada de t de Student en comparaciones entre grupos.

En la Figura 9, se muestran los valores obtenidos en el íB basal de la vía aérea. Los valores basales del íB fueron similares a lo largo del estudio. Los cobayos del modelo de asma mostraron un incremento progresivo del íB basal que fue estadísticamente significativo el día del doceavo reto (Día 125) en comparación con el primero (Día 15) ($n= 7$, respectivamente para el grupo control y modelo de asma; $P < 0.05$).

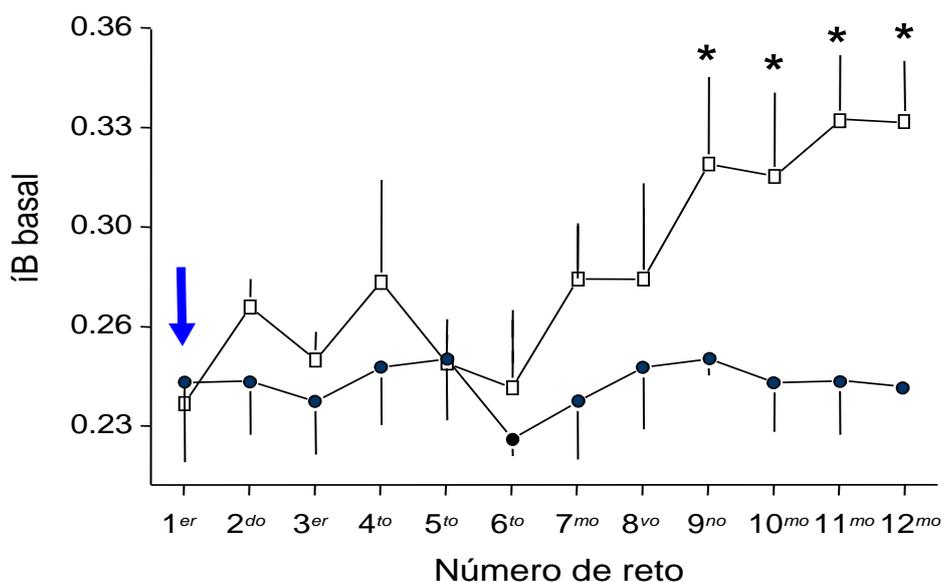


Fig. 9. Incremento progresivo del índice de broncoobstrucción basal en cobayos con asma alérgica crónica. Los valores del íB de cobayos sensibilizados, retados con solución salina (círculos negros) y OVA (cuadros blancos), fueron obtenidos al principio de cada registro pletismográfico * $P < 0.05$ comparada con su respectivo valor del primer reto (ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). La flecha azul señala el valor con el que fue comparada la curva. íB = índice de broncoobstrucción (n=7 para cada grupo).

Expresión de SERCA en el musculo liso mediante Western blot.

Por medio de la técnica de western blot se observó que la expresión de SERCA en miocitos de los cobayos del modelo de asma expresa una disminución en comparación con los miocitos provenientes de los cobayos controles (Figs. 10).

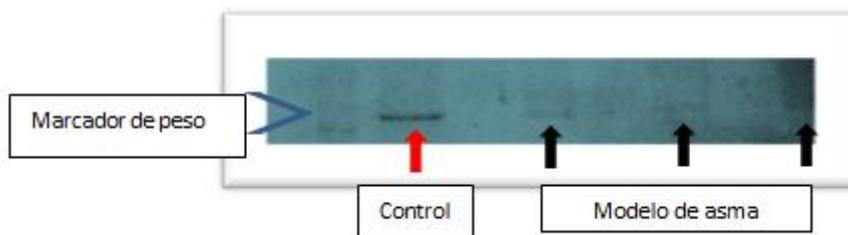


Fig. 10. Imagen de la expresión de SERCA en el MLVA. Las marcas señaladas con las flechas indican la expresión de SERCA en el MLVA, indicando con una flecha roja el grupo control (n=2) y con flechas negras los grupos experimentales (n=4), la columna de la izquierda es el marcador de peso, mostrándonos la ubicación de SERCA en 110 KDa.

Expresión de SERCA e IL-13 en miocitos mediante citometría.

El porcentaje de miocitos que expresaron SERCA e IL-13 en los cobayos controles no mostraron diferencias significativas en comparación con los miocitos provenientes de los cobayos del modelo de asma (Figs. 11 y 12 respectivamente para SERCA e IL-13; n= 7, respectivamente para controles y modelo de asma).

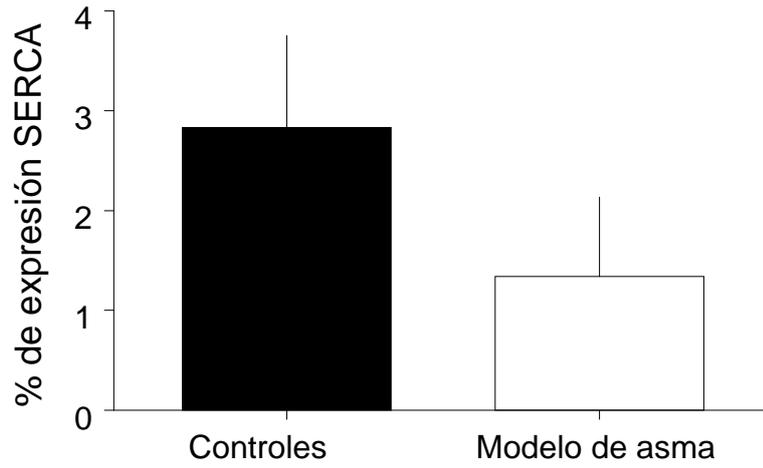


Fig. 11. Expresión de SERCA en miocitos de cobayos en un modelo de asma. Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar (n=7 para cada grupo))

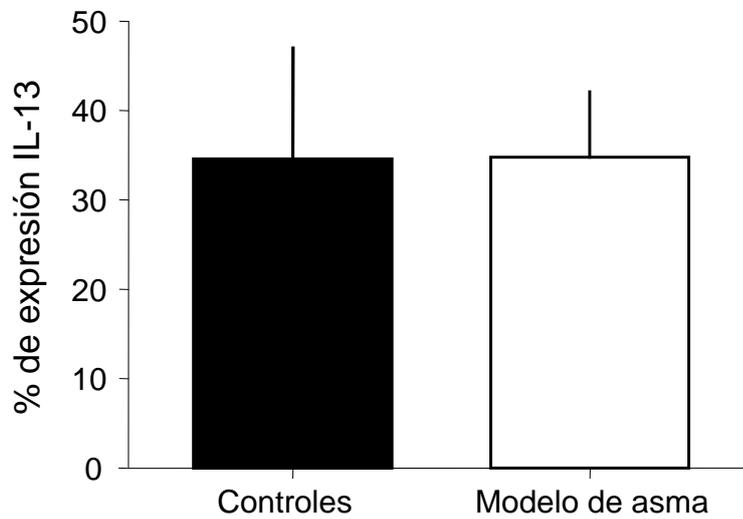


Fig. 12. Expresión de la IL-13 en miocitos de cobayos en un modelo de asma. Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar (n=7 para cada grupo).

Coeficientes de correlación de Pearson para la relación entre la expresión de SERCA con aspectos fisiopatológicos del asma.

La magnitud de la expresión de SERCA correlacionó directamente con la expresión de IL-13 en los miocitos, esto quiere decir que a mayor expresión de IL-13, mayor expresión de SERCA. Por otro lado también se encontró una relación directa entre la magnitud de PD_{200} (post/pre) con la expresión de SERCA, indicando que a menor PD_{200} (post/pre) (hiperreactividad), menor expresión de SERCA. Finalmente, el nivel de obstrucción basal presento una asociación inversa con la expresión de SERCA, esto es, a mayor obstrucción basal, menor expresión de SERCA (Fig. 13).

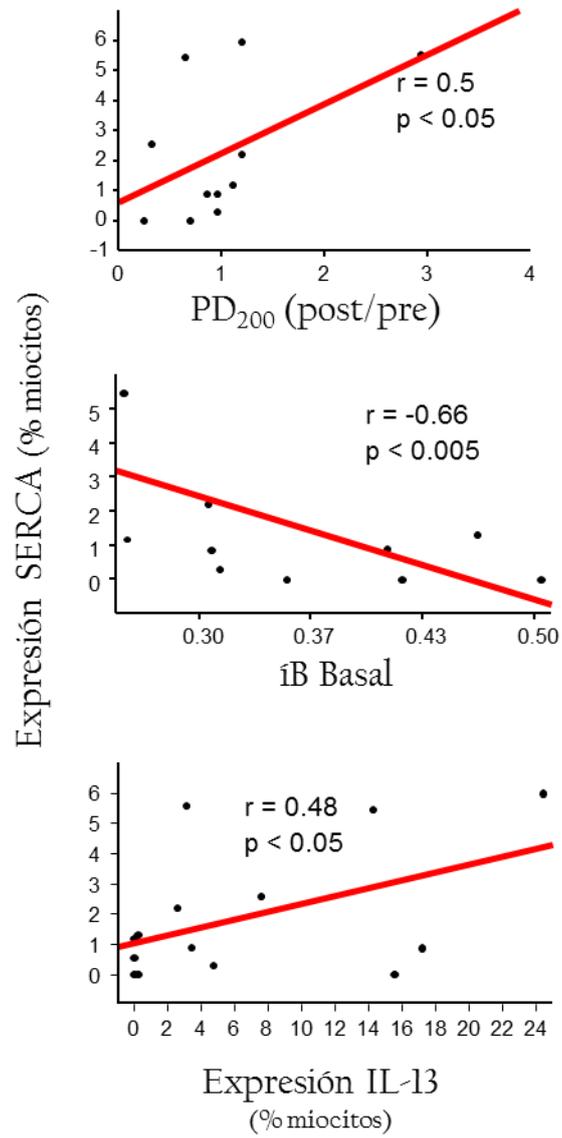


Fig. 13. Relación de la expresión de SERCA con aspectos fisiopatológicos en el asma. Las gráficas muestran la relación de expresión de SERCA con la hiperreactividad (gráfica superior), índice de broncoobstrucción basal (gráfica intermedia) y expresión de IL-13 en miocitos (gráfica inferior).

Discusión.

Las vías aéreas son una serie de conductos ramificados cuya función es permitir la ventilación pulmonar, pero en condiciones patológicas, estos conductos son susceptibles de reducir su calibre ante una gran cantidad de estímulos, condición conocida como hiperreactividad de la vía aérea (Peat & Woolcock, 1989). Muchas enfermedades se caracterizan por inducir hiperreactividad, pero la más común es el asma (Cockcroft and Davis, 2006). Una estructura central en el control de la hiperreactividad de la vía aérea es el músculo liso (Cockcroft and Davis, 2006; Hirota et al., 2009; Zhang and Gunst, 2008). Nosotros observamos que la administración del alérgeno en el modelo de asma en el cobayo induce hiperreactividad de la vía aérea a la histamina, y se observó que la magnitud de esta hiperreactividad se relaciona inversamente con la expresión de la bomba de Ca^{2+} del RS en los miocitos traqueales; así mismo, se observó que el nivel de obstrucción basal de la vía aérea también tuvo una asociación inversa con la expresión de SERCA. Esto sugiere un papel importante de SERCA en la fisiopatología de la vía aérea en el asma.

SERCA es considerada como uno de los sistemas más importantes de transporte de Ca^{2+} celular, y es la proteína más grande de la membrana del RS (Edes y Kranias, 1998). Utilizando ADN recombinante se ha descrito una familia de SERCA, y en el músculo liso de las vías aéreas se expresa la isoforma SERCA2b (Amrani et al., 1995). Esta bomba electrogénica transporta 2 moles de Ca^{2+} por mol de ATP hidrolizado hacia el interior del RS a cambio de protones e iones potasio (Carafoli y Stauffer, 1994). En éste trabajo dilucidamos que la expresión de SERCA (SERCA2b) determinada por Western blot en las tiras de músculo liso se observa disminuida en el modelo de asma en comparación con el control; sin embargo esta reducción no fue estadísticamente significativa cuando se determinó mediante citometría. En este escenario, la asociación entre la expresión de la bomba con dos aspectos importantes de la fisiopatología del asma como son la hiperreactividad y la obstrucción basal mostró que si existe una relación entre éstas variables con SERCA.

En algunos individuos, la persistencia del asma está asociada con cambios estructurales de las vías aéreas (Soboyna, 1984). El significativo fisiopatológico de estos cambios ha generado gran interés y al mismo tiempo controversia (Yamauchi, 2006; Bergeron y Boulet 2006; Pare et al., 1997). En este sentido, los modelos de asma en animales son fundamentales para proporcionar información sobre los mecanismos fisiopatológicos del asma, especialmente en la evolución de los cambios estructurales de la vía aérea y su posible relación con la alteración de las funciones pulmonares. El cobayo en particular es un excelente modelo para estudiar la función pulmonar debido a que son muy susceptibles a generar

respuestas inducidas por alérgenos además de que la broncoobstrucción producida por estos es muy evidente y muy similar al del humano (Karol, 1994).

La obstrucción de la vía aérea durante el asma puede deberse a varios factores como la acumulación de moco, el edema, la contracción del músculo liso y la remodelación. En particular, la remodelación de la vía aérea es un proceso dinámico que sucede cuando una estructura se ha dañado y se reconstruye de manera normal; no obstante, ante un proceso crónico de daño, como ocurre durante la inflamación crónica en el asma, la estructura se trata de reparar en ciclos repetitivos que a veces no son completados y “remodelan” a la vía aérea. En particular en el asma se sabe que la remodelación induce engrosamiento de las paredes de la vía aérea, generada por la hipertrofia e hiperplasia de múltiples estructuras que la conforman. Una consecuencia de estos cambios es la obstrucción residual al flujo de aire (Sobonya, 1984; Cockcroft & Davis, 2006), que en el modelo de asma que conocemos como obstrucción basal.

En un trabajo previo, se observó que el grado de obstrucción basal de vía aérea se relacionó directamente con el grado de fibrosis dentro de la misma (Bazán-Perkins et al., 2009). En el presente estudio vimos que la expresión de SERCA tiene una relación inversa al grado de obstrucción basal. Esto sugiere que probablemente la baja expresión de SERCA contribuya a mantener niveles de Ca^{2+} intracelular lo suficientemente altos como para mantener un mayor tono muscular (Montaño y Bazán-Perkins, 2005).

Una citocina que podría asociarse al fenotipo de miocito involucrado en el incremento de la reactividad de la vía aérea es la IL-13 debido a que es una de las principales citocinas en la regulación de muchos patrones en el asma (Wills-Karp et al., 1998). No obstante, la expresión de esta citocina en las células de músculo liso (citometría) no se modificó en los cobayos del modelo de asma, pero si se observó una relación entre la expresión de ésta citocina en los miocitos con la expresión de SERCA, lo que sugiere que los miocitos del modelo de asma del cobayo, al tener una baja expresión de SERCA y, de manera concomitante de IL-13, son de un fenotipo contráctil, es decir, no están sintetizando mediadores inflamatorios (Wright et al, 2013). En otras palabras, es decir que, SERCA podría expresarse más en fenotipos sintéticos, mientras que su expresión reducida podría asociarse a fenotipos contráctiles.

Conclusiones.

- En el cobayo se puede inducir el modelo de asma alérgica permitiendo el incremento de la reactividad de la vía aérea (hiperreactividad) a la histamina.
- Existe una relación inversa entre la expresión de SERCA con en el aumento del tono y la reactividad de la vía aérea.
- Es probable que la hiperreactividad se desarrolle en un fenotipo de músculo liso de la vía aérea no-sintético.

Referencias

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Shiv, P. (2008). *inmunología Celular y Molecular* (6° ed.). Elsevier.
2. Amrani Y., Magnier C., Enouf J., Wuytack F., Bronner C. Ca²⁺ increase and Ca²⁺-influx in human tracheal smooth muscle cells: Role of Ca²⁺ pools controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform. *Br J Pharmacol* 115: 1205-1210, 1995.
3. Bazán, P. B., Flores, S. E., Barajas, L. C., & Montaña, M. L. (2003). Role of sarcoplasmic reticulum Ca content in Ca entry of bovine irway smooth muscule cells . *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*(368), 277-283.
4. Bazán-Perkins, B. M. (2004). Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmografi: role of catecholamines and nitric oxide. *Exp Physiol*, 89, 623-628.
5. Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest*. 2006, 129(4):1068-87.
6. Bousquet, J., Jeffery, K. P., Busse, W. W., Malcom, J., & Antonio, V. M. (2000). Asthma from Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1720-1745.
7. Carafoli, E., & Brini, M. (2009). Calcium Pumps in Health and Disease. *American Physiological Society*(89), 1341-1378.
8. Carafoli E., Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: Functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 25: 312-324, 1994.
9. Cockcroft, D. W. (2010). Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *CHEST*, 2, 18S-24S.
10. Cockcroft, D. W., & Davis, B. E. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *American Academy of Allergy, asthma and Immunology*, 18(3A), 551-559.
11. Edes I., Kranias E.G. Ca²⁺-ATPases/pumps en: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers*. Second edition Academic press. 225-236, 1998.
12. Ganong, W. F. (2002). *Fisiología Medica* (18 a ed.). Manual Moderno.
13. García, G. E., & Carballo, L. (2007). *Asma*. Bogotá: Panamericana.
14. GINA. (2009). Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for athsma management and prevention*, 112.

15. González, J. F., & Suárez, N. J. (2008). *Diagnóstico y tratamiento en neumología*. Mexico: Manual moderno.
16. Grootendorst, D. C., & Rabe, F. K. (2004). Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the american thoracic society*, 1, 77-87.
17. Grunstein, Hakonarson, H., Leiter, J., Chen, M., Whelean, R., Grunstein, J., y otros. (2002). IL-13-dependent autocrine-signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle. *Am J. Physiology Lung Cell Molecular*, L520-L528.
18. Gunst, J. S., & Wenwu, Zhang. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *AJP Cell Physiology*(295), C567-C587.
19. Gurjit, K., & Khurana, H. (2003). IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 677-690.
20. Holgate, T. S. (2010). A brief History of Asthma and Its mechanisms to Modern Concepts of Disease Pathogenesis. *Allergy Asthma Immunology Research*, 2(3), 165-171.
21. IMSS. (2010). *Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del asma*.
22. Ingram, L. J., & Kraft, M. (2012). IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 829-842.
23. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J*. 1994, 7(3):555-68
24. Kim, Y. H., DeKruyff, H. R., & Umetsu, T. D. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 11(7), 577-584.
25. King, M. S., & Moores, M. K. (2008). Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics. *Respiratory Care*, 53(5), 568-582.
26. Lambrecht, B., & Hammad, H. (Mayo de 2012). The airway epithelium in asthma. *Nature America*, 18(5), 684-681.
27. Mahn, K., Hirst, S. J., Ying, S., & Holt, M. R. (30 de Junio de 2009). Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca ATPase (SERCA) expresion contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *PNAS*, 106(26), 10775-10780.
28. Montañó LM y Bazán Perkins (2005). Resting calcium influx in airway smooth muscle. *J. Physiol Pharmacol* Aug-Sep;83(8-9):717-23
29. O'Byrne, M. F., & Inman, M. D. (2003). Airway Hyperresponsiveness. *CHEST*(123), 411S-416S.

30. Pare PD, Roberts CR, Bai TR, Wiggs BJ. The functional consequences remodeling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1997 52: 589-598

31. Pelaia, G., Renda, T., Gallelli, L., Vatrella, A., Busceti, M. T., Agati, S., y otros. (26 de febrero de 2008). Molecular mechanisms underlying smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. *Respiratory Medicine*(102), 1173-1181.

32. Peat J, Woolcock A, Cullen K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Respir Dis* 1987; 70: 171-179

33. Ramos, R. P., Campos, M. G., Martinez, C. E., Bazán, P. B., & Garcia, Z. E. (2013). Antigen induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho obstruction in sensitized guinea pigs. *Experimental Lung Research*(39), 136-145.

34. Selgrade, M. J., Lemasne, J. R., & Gilmour, M. L. (2006). Introduction of asthma and the environment: what we know and need to know. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 5.

35. Sobonya RE. Quantitative structural alterations in long-standing allergic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1984 130(2):289-92.

36. Vargas, B. M. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y cirugía de tórax*, 68(S2), S91-S97.

37. Vargas, M. (2009). Fisiopatología del asma. *Neumología y cirugía de tórax*, 68(S2), 111-115.

38. Ward, C., Pais, M., Bish, R., Reid, D., Feltis, B., DJohns, y otros. (2002). Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax*(57), 309-316.

39. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD(1988) Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 18;282(5397):2258-61

40. Wright D., Triani Thomas, Sana Siddiqui, Pascoe Chis D., Johnson Jill R, Dekkers Bart G.J., Dakshinamurti Shyamala, Bagchi Rushita, Burgess Janette K., Kanabar Varsha, Ojo Oluwaseun O. (2013). Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (26) 42-49

41. Yamauchi K. Airway remodeling in asthma and its influence on clinical pathophysiology. *Tohoku J Exp Med.* 2006, 209: 75-87.