



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

“Efecto de los bloqueadores de la señal de calcio sobre la proliferación y expresión de colágeno inducida por histamina en fibroblastos de pulmón humano normal”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta:

Lorena Padilla Martínez

Médico Pediatra

Director de Tesis:

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Co-Director:

D.C. Roberto Berra Romani

Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla.

Puebla Pue. Julio 2016



Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
TABLA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES GENERALES.....	5
ASMA.....	5
INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	5
ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO	6
FISIOPATOGENIA	6
REMODELACION PULMONAR.....	7
TRATAMIENTO.....	8
HISTAMINA	9
RECEPTORES DE HISTAMINA (HR)	10
VIA DE SEÑALIZACION DE LOS RECEPTORES DE HISTAMINA	12
EL Ca ²⁺ COMO SEGUNDO MENSAJERO	14
VIA DE SEÑALIZACION DE Ca ²⁺	14
ENTRADA DE Ca ²⁺ DEL MEDIO EXTRACELULAR	15
ENTRADA DE Ca ²⁺ OPERADA POR ALMACEN (SOCE).....	15
REMOCIÓN DE Ca ²⁺ DEL CITOSOL.....	16
BUFFERS DE Ca ²⁺ Y SENSORES DE Ca ²⁺	17
COLÁGENO	17
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	19
EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LOS FENÓMENOS DE FIBROPROLIFERACION	20
JUSTIFICACIÓN:	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25

MATERIAL Y MÉTODOS	26
DISEÑO DEL ESTUDIO:	26
UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO	26
CRITERIOS DE INCLUSION:.....	26
CRITERIOS DE EXCLUSION:	26
DEFINICIÓN DE LA VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICION:.....	27
METODOLOGÍA GENERAL PARA TODOS LOS OBJETIVOS.....	27
PREPARACIÓN DE MEDIO PARA CULTIVO DE FIBROBLASTOS.....	27
TÉCNICA PARA EL CULTIVO DE FIBROBLASTOS.....	27
TÉCNICA PARA LA PROPAGACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	28
TÉCNICA PARA CONGELACIÓN DE FIBROBLASTOS.....	28
TÉCNICA PARA REALIZAR PROLIFERACIÓN CELULAR WST-1 ó CCK8.....	28
EXTRACCION DE RNAm TOTAL POR TECNICA DE TRIzol	29
RT-PCR	29
METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO	30
ANALISIS ESTADISTICO	33
INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA	33
ASPECTOS ETICOS	34
RESULTADOS.....	35
ESTANDARIZACIÓN DE LA TECNICA DE PROLIFERACIÓN	35
TECNICA DE PROLIFERACIÓN ESTANDARIZADA	39
EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN.....	40
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS RECEPTORES H1 Y H2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN	40
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PLC SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN	42
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SERCA SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN	43
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS SOC SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN	44
DETERMINACIÓN DEL GEN DE COLAGENO	45
TECNICA ESTANDARIZADA PARA OBTENCION DEL GEN DE COLAGENO EN FPHN	45
EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLAGENO EN FPHN.....	47
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS RECEPTORES H1 Y H2 SOBRE LA EXPRESION DE COLAGENO EN FPHN	48

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PLC SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN	50
EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BOMBA DE CA ²⁺ DEL RE SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN.....	51
EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS CANALES DE CA ²⁺ OPERADOS POR ALMACÉN (SOC) SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN.....	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES.....	57
ANEXOS	58
BIBLIOGRAFIA:	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis y catabolismo de la histamina..	10
Figura 2. Vía de señalización de los receptores de histamina.....	13
Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de transporte y unión del Ca ²⁺	16
Figura 4. Registro de la señal de Ca ²⁺ evocada por histamina	19
Figura 5. Curvas de calibración celular con concentraciones celulares	35
Figura 6. Experimentos diversos de proliferación con 3 condiciones	37
Figura 7. Curvas de calibración celular en diferentes líneas celulares.....	38
Figura 8. Experimento de proliferación celular con 3 condiciones experimentales.....	39
Figura 9. Efecto de la histamina sobre la proliferación de FPHN a las 48 horas.....	40
Figura 10. Efecto de la inhibición de los receptores de H1 y H2	41
Figura 11. Efecto de la inhibición de la PLC sobre la proliferación en FPHN.....	42
Figura 12. Efecto de la inhibición de la SERCA sobre la proliferación en FPHN.....	43
Figura 13. Efecto de la inhibición de los SOC.....	44
Figura 14. Efecto de la histamina sobre la expresión del gen	46
Figura 15. Efecto de la histamina sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN.	47
Figura 16. Efecto de los antagonistas de los receptores H1	49
Figura 17. Efecto de la inhibición de la PLC	50
Figura 18. Efecto de la inhibición de la SERCA	51
Figura 19. Efecto de la inhibición de los canales de Ca ²⁺ operados SOC	52

INDICE DE TABLAS

TABLA 3. VARIABLES DE MEDICIÓN.....27

TABLA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
2-APB	2-aminoetoxidifenil borato
AMP _c	Adenosin monofosfato cíclico
Ca ²⁺	Ion calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
CDs	Células dendríticas
CPA	Ácido ciclopiazónico
CRAC	Canal activado por liberación de calcio
DAG	Diacilglicerol
DE	Desviación estándar
EC ₅₀	Concentración efectiva que causa 50% del efecto
EGTA	Ácido tetra acético de etileno glicol
FPHN	Fibroblastos de pulmón humano normal
GINA	Guía internacional para el manejo del asma
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
Gα _q	Subtipo de receptor acoplado a proteína G alfa q
Gα _s	Subtipo de receptor acoplado a proteína G alfa s
Gα _{i/0}	Subtipo de receptor acoplado a proteína G alfa i/0
HDC	Histidina descarboxilasa
HNMT	N metil transferasa de histamina
H1R	Receptor tipo 1 de la histamina
H2R	Receptor tipo 2 de la histamina
H3R	Receptor tipo 3 de la histamina
H4R	Receptor tipo 4 de la histamina
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
PIP ₂	Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol trifosfato
ISSAC	Estudio internacional de asma y alergia en niños
μM	Micro Molar
MEC	Matriz extracelular

MMP _s	Metaloproteasas de la matriz colágeno degradantes
NCX	Intercambiador sodio calcio
NMDA	N-metil-D-aspartato
nM	Nano Molar
PG	Prostaglandina
PIP	Procolágeno
PLA ₂	Fosfolipasa A dos
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Bomba de calcio de la membrana plasmática
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
QCV	Queratoconjuntivitis vernal
RE	Retículo endoplásmico
RI	Rango intercuartílico
ROC	Canal operado por receptor
ROI	Región de interés
RS	Retículo sarcoplásmico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RyR	Canales rianodínicos
SFB	Suero fetal bovino
SERCA	Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico
SOC	Canal de calcio operado por almacenes intracelulares
SOCE	Entrada de calcio operada por almacenes intracelulares
TGF- α	Factor de crecimiento tumoral alfa
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
Th	Linfocitos T cooperadores
TIMP _s	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
VEF1	Flujo espiratorio forzado en el primer segundo.
VOC	Canal operado por voltaje

RESUMEN

Introducción: La histamina es una amina biogénica sintetizada principalmente por mastocitos, tiene extensos efectos sobre diversos tipos de células; inicialmente fue atribuida como una molécula responsable de enfermedades alérgicas o llamadas de hipersensibilidad inmediata como el asma, en donde en casos severos presenta complicaciones relacionadas a efectos fibroproliferativos y remodelación de la vía aérea. En el laboratorio se ha documentado que la histamina induce una señal de Ca^{2+} intracelular, pero no se ha relacionado con algún efecto fisiológico.

Objetivo: Determinar el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión de colágena en fibroblastos de pulmón humano normal y determinar, si estos efectos están mediados por la vía de señalización de Ca^{2+} .

Material y Métodos: Los fibroblastos fueron cultivados en medio Ham F-12 con SFB al 10%, posteriormente fueron transferidos de cajas T-25 en confluencia temprana a cajas de 48 y 6 pozos. Se trabajó en dos líneas de cultivos primarios de fibroblastos NOVA y FN-4-12. Las células se pre incubaron con los respectivos antagonistas de los receptores de histamina y con los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} y en presencia de éstos bloqueadores se aplicó la dosis máxima de histamina. La medición de la proliferación y extracción de RNAm para la elaboración de RT-PCR se realizó a las 48 horas de incubadas las células con los reactivos. Los datos se analizaron con estadística paramétrica, reportando promedios \pm DE, se usó la prueba estadística t de Student para muestras independientes y ANOVA para diferencia entre grupos y p significativa < 0.05 .

Resultados: La histamina a dosis de 100 μ M indujo disminución de la proliferación y expresión del gen de colágeno a las 48 horas, en fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN). La disminución de la proliferación estuvo mediada parcialmente por los receptores H1 y H2. La expresión del gen de colágeno solo estuvo mediada por los receptores H1. Con respecto a los bloqueadores de Ca^{2+} y su efecto sobre la proliferación y expresión de colágeno en fibroblastos, observamos que los bloqueadores de la PLC (U73122 y U73343) afectaron directamente la viabilidad de las células, lo cual dificultó la interpretación de los datos. El bloqueador de la bomba del retículo endoplásmico (SERCA), CPA disminuyó por sí mismo la proliferación y expresión del gen en los fibroblastos y el efecto de la histamina no se inhibió en presencia de este bloqueador. El efecto de los bloqueadores de los SOC (2-APB, La^{3+} y Gd^{3+}) en la proliferación de FPHN; se observó que 2-APB revirtió en forma parcial el efecto de la histamina, mientras que en presencia

de lantano y gadolinio la histamina no revirtió su efecto. Con lo que respecta al efecto de los bloqueadores de los SOC sobre la expresión del gen de colágeno, se observó que ninguno de estos bloqueadores revirtió el efecto de la histamina.

Conclusiones: Con las condiciones experimentales empleadas, la histamina disminuyó la proliferación de los fibroblastos, así como la expresión del gen de colágeno. Se da evidencia que la expresión del gen de colágeno en nuestros cultivos de fibroblastos está mediada principalmente por los receptores H1 de la histamina. En base a los resultados de nuestros experimentos, es difícil concluir que el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión del gen de colágeno en nuestros fibroblastos de pulmón humano normal, este mediado por la vía de la señalización de Ca²⁺, ya que sólo 2-APB bloqueó parcialmente el efecto de la histamina en el fenómeno de proliferación.

INTRODUCCION

Hace más de un siglo que la histamina fue descubierta como una molécula responsable de enfermedades alérgicas. Sin embargo, recientes acontecimientos en una gran variedad de campos de investigación han comenzado a aclarar una función mucho más compleja y diversa de dicha molécula, de sus receptores y de su metabolismo. Se han realizado estudios experimentales donde se ha observado el efecto de la histamina como un promotor de la proliferación de fibroblastos (Jordana y cols., 1988; Veerappan y cols., 2013) y que por lo tanto pudiera participar en el proceso de fibrogénesis de enfermedades pulmonares crónicas como el asma.

En el pulmón muchos tipos de agresiones pueden desencadenar una cascada de eventos que conlleven al desarrollo de fibrosis pulmonar, comprometiendo completamente el funcionamiento de la vía aérea. Dependiendo del tipo de lesión la resolución de la fibrosis podría ser posible si la exposición futura del agente dañino fuese evitada. Desafortunadamente hay muchos casos en los cuales la etiología de la enfermedad es desconocida resultando en un síndrome clínicamente llamado “idiopático” (Stramer y cols., 2007). Kawanami y cols., 1979; demostraron que los pulmones de pacientes con diversos trastornos fibróticos existe un incremento del número de mastocitos y que éstas células parecían sufrir un proceso de degranulación crónica (Kawanami y cols., 1979). La relación entre inflamación y fibrosis es complicada, pero ya existe suficiente evidencia que sugiere que las células inflamatorias influyen en la fibrosis por liberación de mediadores fibrogénicos (Stramer y cols., 2007). El incremento del número de mastocitos asociados con fibrosis pulmonar está bien documentado, ya que contribuyen en la respuesta inflamatoria pero su papel en el proceso de fibrogénesis no está aún esclarecido (Veerappan y cols., 2013).

En el Laboratorio de Medicina Experimental y en el laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la BUAP se realizó un estudio en donde se observó que la aplicación de histamina a cultivos celulares de fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN) causó una señal de Ca²⁺ intracelular de forma dosis-dependiente (Romano Bernabe, 2012). Sin embargo, aún no se sabe si esta señal de Ca²⁺ intracelular inducida por histamina es directamente la responsable del incremento en la proliferación y producción de colágena por los fibroblastos. Se han descrito hasta la fecha 4 receptores de histamina por medio del cual esta molécula ejerce su efecto a nivel celular. Existen en el mercado agonistas y antagonistas específicos para cada uno de éstos receptores y a través de los cuales se puede reproducir una respuesta en modelos in vitro ya sea

inhibiéndolos o estimulándolos. También se cuenta con bloqueadores específicos de cada uno de las vías de la señalización de Ca²⁺. Este estudio tiene como objetivo investigar el efecto que tienen los bloqueadores de la señal de Ca²⁺ sobre la proliferación celular y la expresión de colágena inducidas por histamina en fibroblastos de pulmón normal.

ANTECEDENTES GENERALES

ASMA

El asma es una enfermedad heterogénea, caracterizada por inflamación crónica de la vía aérea, sus principales manifestaciones clínicas son: sibilancias, dificultad para respirar, opresión torácica y tos que varían con el tiempo y en intensidad, junto con una limitación variable del flujo espiratorio (GINA, 2015). Diversos estudios han descrito una red compleja de respuesta inflamatoria que participa en la fisiopatología del asma, la cual involucra la liberación de mediadores, como eicosanoides, citocinas, quimiocinas, proteasas e histamina (Horie y cols., 2014).

INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La prevalencia del asma se está incrementando en todo el mundo, y especialmente en niños; afectando de 1 a 18% de la población en diferentes países (GINA, 2015); por lo cual es ahora reconocida como un serio problema global de salud, se estima que existen aproximadamente 300 millones de pacientes y en la actualidad es causa de muerte en todo el mundo, estimando 250 000 muertes por esta causa al año (Horie y cols., 2014).

El asma es la enfermedad crónica más común en la infancia, afectando alrededor de 1 de cada 8 niños alrededor del mundo, y el 9.1% (6.7 millones de niños) en Estados Unidos (Lai y cols., 2009). Es la principal causa de hospitalización y ausentismo escolar en niños de todo el mundo. Sólo en Estados Unidos, causa más de 10.5 millones de visitas médicas anualmente, y proyecta un costo superior a los 20 millones de dólares en gastos de salud y pérdida de la productividad. En el Reino Unido, 70% de los padres de niños asmáticos piden tiempo en su trabajo para el cuidado de sus hijos, y cerca del 13% abandonan su trabajo completamente. Es más común en países desarrollados, sin embargo cada vez es más frecuente en los países en vías de desarrollo lo cual parece estar relacionado al incremento de la urbanización de las comunidades. Desde 1950 al 2000, la prevalencia del asma en Europa incrementó dramáticamente, y posteriormente disminuyó durante la última década. Esto varía a través de Europa desde este a oeste, lo cual probablemente se debe a cambios simultáneos del estilo de vida en Europa occidental. La prevalencia más baja reportada es de 1.6% en Albania y la mayor en el Reino Unido 20.7%. (Karimi y cols., 2015).

El estudio ISAAC (International Study of Asthma and Allergy in Childhood), demostró que la prevalencia de asma en niños y adolescentes es muy variable en el mundo, siendo menor al 2% en algunos países y mayor a 25% en otros (Strachan y cols., 2015) . En México la

prevalencia también es variable, por ejemplo en la ciudad de México es de aproximadamente 5% mientras que en Mérida, Yucatán es de 12%. Esta variabilidad también se correlaciona de forma inversa con la altitud de la región y de forma directa con su temperatura. Su frecuencia también se ve incrementada en algunas épocas del año siendo más frecuente entre octubre y enero. La mayor incidencia ocurre en niños, disminuye en la adolescencia y adultez temprana, y aumenta ligeramente en etapas subsecuentes. En los niños es más frecuente en varones, pero pasada la adolescencia se vuelve más común en mujeres (Vargas Becerra, 2009).

En Guadalajara, Jalisco se realizó un estudio en niños en edad escolar, para determinar factores asociados a la enfermedad, reportando una prevalencia de 8.1% de asma, obesidad de 19.9%, antecedente de tabaquismo paterno del 6.7% y en la madre de 13.3%; concluyendo que ni la obesidad, ni el tabaquismo pasivo son factores asociados con asma en niños mexicanos (Bedolla-Barajas y cols., 2013).

ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

Falta mucho por saber acerca de la etiología de ésta enfermedad. Sin embargo, la predisposición genética es claramente evidente, la interacción genes-medio ambiente probablemente explique mucho de la variación internacional en los índices de prevalencia para alergia y asma. Factores ambientales tales como infecciones y exposición a endotoxinas pueden ser protectores o pueden actuar como factores de riesgo, dependiendo del tiempo de exposición durante la lactancia y la niñez. Algunos factores de riesgo prenatales, incluyendo el tabaquismo materno, han sido firmemente establecidos, pero la dieta y la nutrición, el estrés, el uso deliberado de antibióticos pueden también afectar el desarrollo temprano de alergias y asma. Posteriormente en la niñez, otros factores de riesgo incluyen exposición a alérgenos, alimentación al seno materno (el cual puede inicialmente proteger y posteriormente incrementar el riesgo de sensibilización), el tamaño y la estructura familiar, así como el sexo (Subbarao y cols., 2009).

FISIOPATOGENIA

Las enfermedades alérgicas están caracterizadas por elevación de los niveles séricos de Inmunoglobulina E y por una hipersensibilidad a antígenos inocuos normales como los alérgenos. Un alérgeno particular primero se encuentra directamente con las células presentadoras de antígenos (CPA), como lo son las células dendríticas o macrófagos. El alérgeno capturado por las CPA es procesado y presentado a los linfocitos T CD4+. Las células T CD4+ son polarizadas en distintos tipos de células Th (cooperadoras). El principal grupo de células Th incluye a las Th1,

Th2 y Th17 y más recientemente fueron descubiertas las células Th9 y T_{FH}. Cada grupo de células Th expresa citocinas con un perfil característico que genera una respuesta inflamatoria en las enfermedades alérgicas, como el asma bronquial. Entre estas células Th, las células Th2 juegan un papel clave en la patogenia del proceso inflamatorio en las enfermedades alérgicas (Akdis y cols., 2004).

Las células Th2 producen citocinas, interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, pero pueden ser producidas por otro tipo de células. La IL-4 y la IL-13 son las citocinas representativas de los de linfocitos Th2 que juegan un rol importante en las enfermedades alérgicas en humanos. La IL-4 promueve la diferenciación y proliferación de células Th2, mientras que la IL-13 media la hiperreactividad bronquial y la producción de moco. La IL-5 es una citocina que es altamente específica para la activación y reclutamiento de eosinófilos y contribuye a la inflamación eosinófila, una de las principales características del asma. Las citocinas de las células Th2 disparan la producción de quimiocinas en los fibroblastos o células epiteliales como la CCL₁₁/eotaxina, CCL₁₇/TARC y CCL₂₂/quimocina derivada de macrófago, también promueven la infiltración de células inflamatorias como eosinófilos y células Th2 en sitios expuestos a alérgenos. La IL-4 y la IL-13 estimulan la producción de IgE en mastocitos o basófilos, que conduce a la liberación de citocinas inflamatorias y mediadores químicos como histamina, leucotrienos y prostaglandina D2 en mastocitos. La PGD2 causa broncoconstricción, vasodilatación, incremento en la permeabilidad capilar y aumento en la producción de moco en el asma. Esto tal vez facilita la migración transendotelial de células inflamatorias como eosinófilos, mastocitos, linfocitos y monocitos durante el proceso inflamatorio alérgico (Arima y Fukuda, 2011).

REMODELACION PULMONAR

En sus fases crónicas los pacientes con asma presentan un proceso de remodelación pulmonar, que es un daño producido sobre el epitelio de la vía aérea que estimula la generación de factores de crecimiento fibrolinfoproliferativos; las características patológicas de ésta remodelación de la vía aérea incluyen incremento del volumen del musculo liso, activación de fibroblastos y fibrosis subepitelial (Bara y cols., 2010; Del-Rio-Navarro y cols., 2006). Los fibroblastos de pulmón activados convierten su fenotipo en miofibroblastos para adquirir la propiedad contráctil la cual genera fuerza de contracción, y además participa en la remodelación tisular a través de la degradación / producción de matriz extracelular. Se especula que los fibroblastos activados participan en la broncoconstricción, aumentando la acción de las células

del músculo liso bronquial para causar una limitación al flujo de aire. Estos fibroblastos son la clave del objetivo terapéutico en el tratamiento del asma (Hinz y cols., 2012).

La fibrosis subepitelial es un rasgo característico de la remodelación de la vía aérea. Este cambio involucra el espacio subepitelial y el engrosamiento puede ser desde 7 hasta 23 mm en sujetos con asma, contra 4 a 5 mm en sujetos controles. La membrana basal epitelial consta de 2 estratos: la lámina basal y la lámina reticular. El engrosamiento del espacio subepitelial corresponde a un incremento en el depósito de colágeno tipo I, III, V así como fibronectina, laminina y tenascina, además de otras sustancias incluyendo elastina, proteoglicanos y cartílago (Constantino y Mello Jr, 2009). El mecanismo de depósito de matriz extracelular es debido a un desequilibrio entre la síntesis y la degradación. El depósito de colágeno en los tejidos está controlado por un equilibrio entre las metaloproteasas de la matriz colágeno degradantes (MMPs) y sus inhibidores, los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). En asma, los miembros más importantes de esta familia son la MMP-9 y el TIMP-1. La expresión incrementada de TIMP-1 causa depósito de matriz extracelular (Al-Muhsen y cols., 2011). Los estudios en pacientes asmáticos han revelado el incremento en la producción de MMP-9 y el TIMP-1 en esputo y fluido de lavado bronquial. La principal fuente de MMP-9 en la vía aérea de pacientes asmáticos se cree que son los eosinófilos (Tagaya y Tamaoki, 2007).

La visión convencional del estrechamiento de la vía aérea en los asmáticos implica una respuesta de fase temprana a la inhalación de alérgenos seguido por la reacción de fase tardía caracterizada por infiltración de células inmunes e inflamación celular. En este proceso, la histamina es liberada desde células cebadas o basófilos sensibilizados por antígenos, y tienen un papel importante en la inflamación alérgica a través de su capacidad de producir contracción del músculo liso y promoción la permeabilidad vascular (O'Mahony y cols., 2011).

TRATAMIENTO

Los corticosteroides inhalados son los medicamentos antiinflamatorios más eficaces para el tratamiento del asma persistente, ya que han mejorado drásticamente su evolución; sin embargo, aproximadamente, el 10% de los pacientes con asma grave persistente, permanecen mal controlados a pesar de un tratamiento óptimo y presentaran mayor mortalidad. En éstos casos, la limitación irreversible al flujo de aire y las alteraciones en la estructura de la vía aérea, secundarias al proceso inflamatorio crónico, que ya han sido descritas y se han denominado “remodelación de la vía aérea” (Al-Muhsen y cols., 2011).

Los antagonistas de los H₁R se utilizan ampliamente en el tratamiento del asma especialmente en los casos complicados con enfermedades atópicas, tales como rinitis alérgica, urticaria y dermatitis atópica. En una revisión reciente de ensayos clínicos, se ha demostrado que estos antagonistas son benéficos para el alivio de los síntomas de asma en los pacientes con rinitis alérgica, mientras que la guía GINA, no recomienda los antihistamínicos como tratamiento de primera línea en el asma (GINA, 2011). Permanece la interrogante si, los antihistamínicos pueden ser benéficos para los asmáticos con y sin enfermedades atópicas (Horie y cols., 2014). Por lo tanto, aclarar su efecto sobre la remodelación de la vía aérea puede ayudar a esclarecer el papel de los antihistamínicos en el tratamiento del asma.

La evidencia de que la histamina tenía un papel activo en la fisiopatogenia de las enfermedades alérgicas y anafilácticas, fue el estímulo para investigar componentes que inhibieran sus efectos patológicos (Parsons y Ganellin, 2006a).

HISTAMINA

La histamina pertenece a la familia de las aminas biogénicas, al igual que la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, se distribuye ubicuamente en el cuerpo humano. Es un potente mediador de la inflamación y regulador de la respuesta inmune innata y adquirida (Saligrama y cols., 2012). Atraviesa escasamente la barrera hematoencefálica, por lo cual la histamina presente en el SNC proviene de las neuronas histaminérgicas y, en menor proporción, de los mastocitos, los cuerpos celulares de estas neuronas se localizan en el núcleo tubero-mamilar del hipotálamo posterior (Wada y cols., 1991). A nivel periférico, la histamina es sintetizada principalmente por los mastocitos, basófilos, células enterocromafines gástricas, pero otro tipo de células como las plaquetas, células dendríticas (CDs) y células T, también pueden expresar histidina descarboxilasa (HDC) (Tanaka y cols., 2004).

Estructuralmente, la histamina [2-(4-imidazolil) etilamina] tiene un anillo imidazol y un grupo etilamino como cadena lateral. Es el producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, una reacción catalizada por la HDC, que requiere fosfato de piridoxal como cofactor (Parsons y Ganellin, 2006b)(figura 1). Su síntesis requiere de dos pasos: el transporte de L-histidina al interior de la célula y su posterior descarboxilación por la HDC. La HDC se ha logrado purificar de varios tejidos periféricos, como hígado, riñón y mucosa gástrica, su expresión es influenciada por citocinas, incluyendo IL-1, IL-3, IL12, IL-18, factor estimulante de la colonia de macrófagos y FNT- α (Tanaka y cols., 2004)

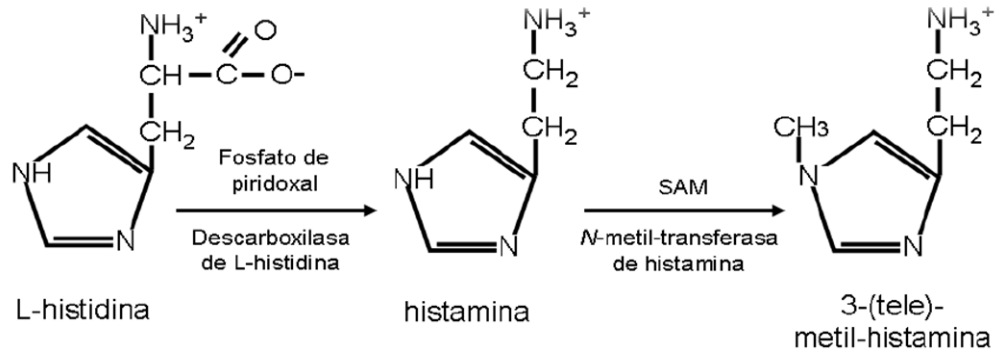


Figura 1. Síntesis y catabolismo de la histamina. El aminoácido L-histidina es descarboxilasa a histamina, reacción catalizada por la enzima descarboxilasa de histidina. Catabolizada por N-metiltransferasa de histamina, convirtiéndola en un metabolito inactivo 3-(tele)-metil-histamina.

La histamina se almacena en gránulos principalmente en mastocitos y basófilos, es liberada por exocitosis rápida y transitoria en respuesta a diversos estímulos (Jutel y cols., 2009). Tiene extensos efectos sobre diversos tipos de células, tales como células presentadoras de antígenos, células naturales asesinas, células epiteliales, linfocitos T y B (O'Mahony y cols., 2011). Numerosos estudios han demostrado la función de la histamina como modulador de la inflamación y de la respuesta inmune, otras función relevante es la de actuar como neuromodulador; ya que participa en la regulación sueño-vigilia, ingestión de agua y alimento, conducta motora y sexual, aprendizaje, memoria, entre otras muchas funciones (Haas y cols., 2008; Parsons y Ganellin, 2006a).

Una vez liberada, su degradación ocurre básicamente por metilación u oxidación, la primera es catalizada por la enzima N-metil transferasa de histamina, la cual utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como donador del grupo metilo; el producto de ésta reacción es la 3-(tele)-metil-histamina que es metabolizada por la monoamino oxidasa tipo B (MAO_B), produciendo el ácido 3-(tele)-metil-imidazol-acético (Ogasawara y cols., 2006). La oxidación se lleva a cabo por la enzima diamino-oxidasa, la cual transforma a la histamina en ácido imidazol-acético, que puede conjugarse para formar un ribósido (O'Mahony y cols., 2011).

RECEPTORES DE HISTAMINA (HR)

El efecto de la histamina es mediado a través de receptores que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), de los cuales se han identificado 4 subtipos H1R, H2R, H3R y H4R en base a sus características farmacológicas, moleculares y funcionales

(Thurmond y cols., 2008). Los GPCR llamados así por su interacción con proteínas G, también se conocen como receptores transmembrana de 7 dominios (7TM); ya que contienen 7 hélices transmembrana α -helicoidal, unidas por asas (“bucles”); la terminación amino permanece fuera de la célula y la terminación carboxilo dentro (Fredriksson y cols., 2003). La proteína G posee 3 subunidades polipeptídicas diferentes, llamadas α , β y γ ; que tienen la capacidad de unirse a nucleótidos de guanina, ya sea GDP o GTP (Dy y Schneider, 2004).

El receptor H1 (H1R) es una proteína de 56Kd codificado por un gen sin intrones, localizado en el cromosoma 3p25 y contiene 487 aminoácidos. El H1R es expresado por una gran variedad de células, incluyendo neuronas, células de las vías aéreas y de musculo liso vascular, hepatocitos, condrocitos, células epiteliales, CDs, monocitos, neutrófilos y células T y B. La expresión de los H1R puede ser aumentada por IL-3, IL-4 e histamina, su activación resulta en contracción de las células vasculares del musculo liso en vía aérea, incrementando la permeabilidad del endotelial vascular, síntesis de prostaciclina, factor activador de plaquetas, liberación de factor de von Willebrand y óxido nítrico. La típica respuesta de hipersensibilidad inmediata de reacciones alérgicas, tales como enrojecimiento, conjuntivitis, rinorrea, broncoconstricción, urticaria son el resultado de la activación de los H1R (Akdis y cols., 2004).

El receptor H2 (H2R) es una proteína de 40 Kd formada por 359 aminoácidos. Es codificada por un gen sin intrones, localizada en el cromosoma 5q35.5; en humanos el receptor H2R muestra una alta secuencia homóloga (83 a 95% identidad) a otras especies (cobayos, ratones, ratas y perros). El H2R es expresado por una gran variedad de tejidos y células incluyendo cerebro, células parietales gástricas, células del musculo liso, células T y B, CDs y tejido cardiaco. En el SNC se encuentran en las neuronas del hipocampo, la amígdala, los núcleos del rafe, la sustancia negra; con respecto a su localización celular, a diferencia de los H1R, los H2R son eminentemente postsinápticos (Haas y cols., 2008). H2R puede antagonizar ciertos efectos de los H1R. Por ejemplo, H2R es responsable de la relajación de células musculares lisas en los vasos sanguíneos, útero y vía aérea. Además, puede modular un rango de actividades del sistema inmune, tales como degranulación de células cebadas, síntesis de anticuerpos, producción de citocina, Th1 y proliferación de células T (Jutel y cols., 2009; Meiler y cols., 2008).

El receptor H3 (H3R) es una proteína de 70 Kd y 445 aminoácidos, contiene 4 exones, localizado en el cromosoma 20q13.33. Inicialmente, este receptor fue identificado por su habilidad para regular la liberación de histamina y otros neurotransmisores y por ello fue

clasificado como un autoreceptor presináptico en el SNC y periférico (Tardivel-Lacombe y cols., 2001). También se encuentra en endotelio y células enterocromafines. El H3R es importante en el ciclo vigilia sueño, cognición, niveles de energía y regulación de la homeostasis e inflamación (O'Mahony y cols., 2011).

El receptor H4 (H4R), muestra una homología cercana al 40% con el H3R, el gen que codifica para el receptor se encuentra en el cromosoma 18q11.2, contiene 390 aminoácidos, 3 exones y dos intrones. Tiene propiedades farmacológicas y moleculares que son similares a los H3R. Se encuentra principalmente en células de origen hematopoyético. Es un importante receptor para la quimioatracción de células relevantes inmunológicamente, tales como eosinófilos, células cebadas, neutrófilos, células T, CD8, además de influir en la producción de citocinas por estas células. También ha mostrado que juega un papel importante en nocicepción, desordenes autoinmunes, cáncer de colón y mama, así como en alergias (Dunford y cols., 2006).

VIA DE SEÑALIZACION DE LOS RECEPTORES DE HISTAMINA

Los H1R se encuentran acoplados a proteínas $G\alpha_{q/11}$ (figura 2 A) y al ser activados, inducen la hidrólisis de fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por acción de la fosfolipasa C (PLC β), generando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros (Esbenshade y cols., 2003). El IP₃ se une a receptores de IP₃ (IP₃R) presentes en la membrana del retículo endoplásmico (RE) promoviendo la liberación de Ca²⁺ de éste depósito. Por otro lado el DAG activa a las isoformas de la proteína cinasa C (PKC) que depende de Ca²⁺ y fosfolípidos, lo que resulta en la fosforilación de receptores, enzimas, canales iónicos y otras proteínas, desencadenando múltiples respuestas celulares (Hough, 2001).

Los H2R se acoplan a proteínas $G\alpha_s$ y su activación estimula a varias isoformas de la enzima adenilil-ciclasa (figura 2 B), produciendo un incremento en la formación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) la cual a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc (Esbenshade y cols., 2003). Al unirse el AMPc a las subunidades reguladoras de la PKA, se liberan las subunidades catalíticas de esta cinasa, las cuales fosforilan residuos de serina y treonina de diversas proteínas, como la proteína de unión a CRE (CREB), una proteína nuclear que se une al AMPc dentro del promotor de genes que responden a éste, activando su transcripción (Notcovich y cols., 2010).

Los H3R se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ que induce disminución en las concentraciones intracelulares de AMPc, lo que da como resultado una disminución de toda la cascada desencadenada por esta molécula, como la transcripción de genes activada por CREB (figura 2

C). Otro efecto es la inhibición de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo N y P/Q; inducir liberación de ácido araquidónico (AA) por la activación de la PLA_2 (Molina-Hernandez y cols., 2001); inhibición del intercambiador Na^+/H^+ ; activar la vía de proteína cinasa activadas por mitógenos (MAPKs); activar a la proteína cinasa B (PKB o Akt) (Silver y cols., 2002).

Los H4R se acoplan al igual que los H3R a proteínas $G\alpha_{i/o}$, inhibiendo por lo tanto la formación de AMPc (figura 2 D). Otras vías de señalización son la activación de MAPKs y movilización de Ca^{2+} en mastocitos y eosinófilos (Nakamura y cols., 2000).

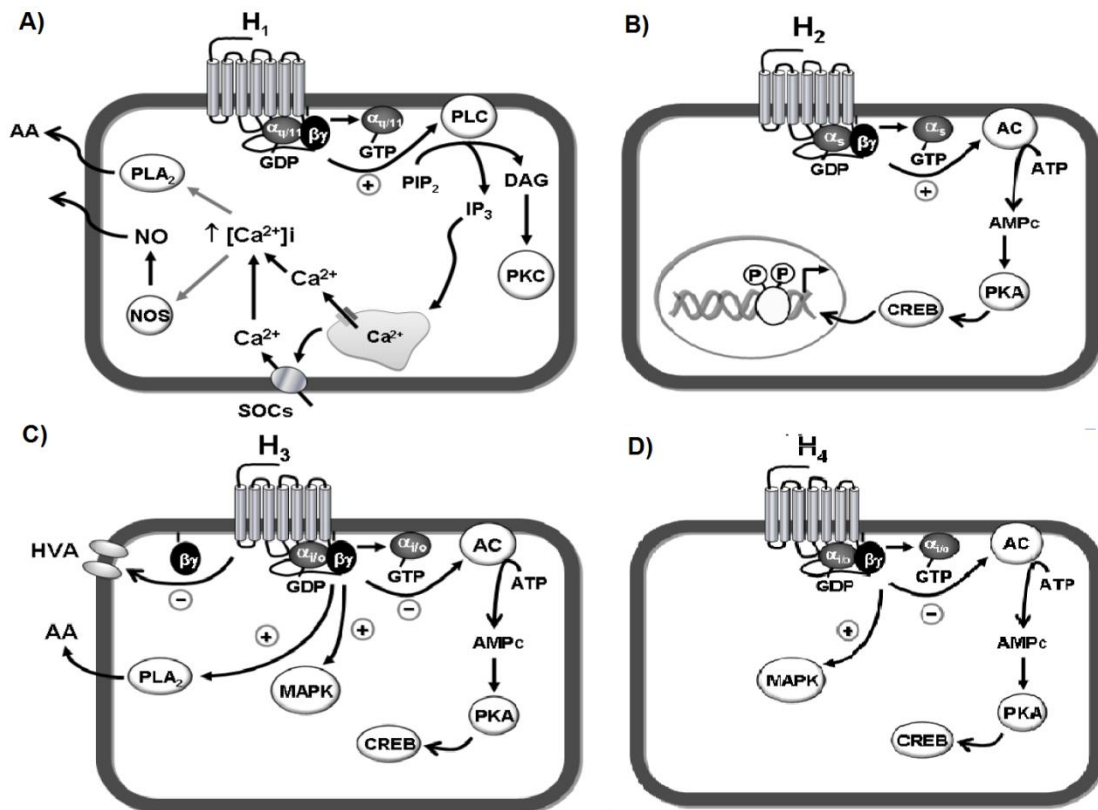


Figura 2. Vía de señalización intracelular de cada uno de los receptores de histamina. A) Los H1R se acoplan a proteínas $G\alpha_{q/11}$ activando la vía de la PLC. B) Los H2R se acoplan a proteínas $G\alpha_s$ y su activación estimula a varias isoformas de la enzima adenilil-ciclasa (AC). C) y D) Los H3R y H4R se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ influyendo en la disminución de las concentraciones intracelulares de AMPc.

El Ca^{2+} es una señal intracelular altamente versátil, su acción es simple: las células en reposo tienen una concentración de Ca^{2+} de 100 nM pero se activan cuando este nivel se eleva

aproximadamente a 1000 nM. Esta versatilidad surge del uso de un extenso repertorio molecular y de componentes de señalización (Berridge y cols., 2000).

EL Ca²⁺ COMO SEGUNDO MENSAJERO

El Ca²⁺ es ion más abundante en el cuerpo humano, siendo primordial para mantener el balance celular, reflejando la importancia del Ca²⁺ como un segundo mensajero; ya que participa en una gran variedad de procesos celulares como metabolismo, fosforilación y desfosforilación proteica, proliferación celular, división y diferenciación celular, transcripción genética, fertilización, inmunidad, motilidad celular, excitación-contracción muscular, apoptosis y neurotransmisión (Berridge, 2012). Mantener la homeostasis del Ca²⁺ es un proceso altamente integrado, donde participa un elaborado sistema de circuitos de retroalimentación y un conjunto de componentes para crear la señalización de Ca²⁺, como transportadores, canales, intercambiadores, proteínas de unión, buffers y bombas (Krebs y cols., 2015)(Krebs y cols., 2015)(Krebs y cols., 2015). Cada tipo de célula expresa un conjunto único de componentes para crear su sistema de señalización de Ca²⁺, con propiedades espaciales y temporales diferentes; sin embargo, casi todos los sistemas de señalización tienen una cosa en común, que funciona mediante la generación de pulsos breves de Ca²⁺ (Berridge y cols., 2003). Ya que altas concentraciones de Ca²⁺ en la célula por largos periodos de tiempo pueden desencadenar muerte celular (Krebs y cols., 2015).

VIA DE SEÑALIZACION DE Ca²⁺

La vía de señalización de Ca²⁺ puede desencadenarse, ya sea por la entrada de Ca²⁺ desde el espacio extracelular o a través de la liberación de Ca²⁺ de los compartimentos de almacenamiento interno. El mecanismo más importante de movilización de Ca²⁺ intracelular es a través de la vía del IP₃, que induce liberación de Ca²⁺ del RE (principal depósito de Ca²⁺ intracelular) (Guzman-Silva y cols., 2015). La cascada de señalización inicia típicamente en la membrana plasmática, donde la interacción de un ligando extracelular se une a un receptor específico acoplado a GPCR, activando a PLCβ. La PLC es una proteína soluble que se encuentra principalmente en el citosol, y al ser activada se dirige a la membrana plasmática, donde hidroliza al PIP₂ (un fosfolípido de membrana) dando lugar a la formación de IP₃ y DAG (Guerrero-Hernandez y cols., 2010). El IP₃ difunde rápidamente hasta la membrana del RE, donde activa receptores inotrópicos sensibles a IP₃, conocidos como receptores para IP₃ (IP₃Rs) (Krebs y cols., 2015) (figura 3); liberando Ca²⁺ del RE al citosol, elevando de éste modo la [Ca²⁺]_i. El Ca²⁺ liberado de los almacenes intracelulares algunas veces es insuficiente para la total activación de los procesos celulares, por lo cual la entrada de Ca²⁺ extracelular permite un incremento sustancial en la [Ca²⁺]_i. La entrada de Ca²⁺ es un proceso ubicuo que ocurre a través

de diversos canales de membranas permeables a Ca²⁺ (Berra-Romani y cols., 2008; Guzman-Silva y cols., 2015).

Homólogos a los IP₃R son los receptores inotrópicos permeables a Ca²⁺, llamados receptores rianodínicos (RyR), los cuales reciben su nombre debido a su alta afinidad al alcaloide rianodina (Berridge, 2012). Estos receptores son activados también por cafeína, Ca²⁺ y un metabolito de la nicotidamida-adenín-dinucleótido (NAD⁺), el ADP ribosa cíclico. En células musculares, los RyR están principalmente localizados en el retículo sarcoplásmico (RS) y en células no musculares se expresan en el RE. Son homo-tetrámeros y presentan sensibilidad al Ca²⁺ de manera bifásica (Van, 2012).

ENTRADA DE Ca²⁺ DEL MEDIO EXTRACELULAR

La [Ca²⁺]_i en una célula en reposo es de aproximadamente 100nM y está determinada por el complejo equilibrio entre los mecanismos de ingreso y egreso del ión (Iino, 2010). El Ca²⁺ puede entrar a la célula a favor de su gradiente de concentración a través de una variedad de canales localizados en la membrana plasmática. Estos incluyen a canales voltaje dependientes (VOC) en células excitables; canales operados por receptor o ligando (o receptores inotrópicos ROC) como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), canales activados por un agonista intracelular (SMOC), y canales de Ca²⁺ operada por almacenes intracelulares (SOC) (Berridge, 2012; Krebs y cols., 2015). En FPHN se ha reportado que el ingreso de Ca²⁺ extracelular después de la estimulación con histamina fue a través de los SOC (Romano Bernabe y cols., 2012)

ENTRADA DE Ca²⁺ OPERADA POR ALMACEN (SOCE)

El RE juega un papel primordial en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺. La entrada de Ca²⁺ del medio extracelular mediada por los SOC, es activada por la depleción de Ca²⁺ del RE. Este mecanismo de entrada de Ca²⁺ fue posteriormente caracterizada como canales activados por la liberación de Ca²⁺ (CRAC) (Parekh y Putney, Jr., 2005), pero los detalles moleculares de este mecanismo aún son desconocidos. Ahora se sabe que los participantes moleculares del proceso SOCE han sido identificados como STIM (Moléculas de interacción estromal) y ORAI, un componente esencial de los CRAC (Smyth y cols., 2010). La interacción de estas dos proteínas de membrana es requerida para la activación de los SOC. STIM1 se localiza en la membrana del RE y ORAI en la membrana plasmática (figura 3). STIM1 es una proteína que está constituida por un solo dominio transmembranal y contiene un dominio EF en el extremo N-terminal que, a su vez, penetra en el lumen del RE. La disminución de la

concentración de Ca^{2+} en el RE, es censada por este dominio que favorece la migración de STIM1 hacia la porción del RE que se encuentra en estrecho contacto con la membrana plasmática, interactuando físicamente con ORAI, que se considera el canal que permite la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (Krebs y cols., 2015).

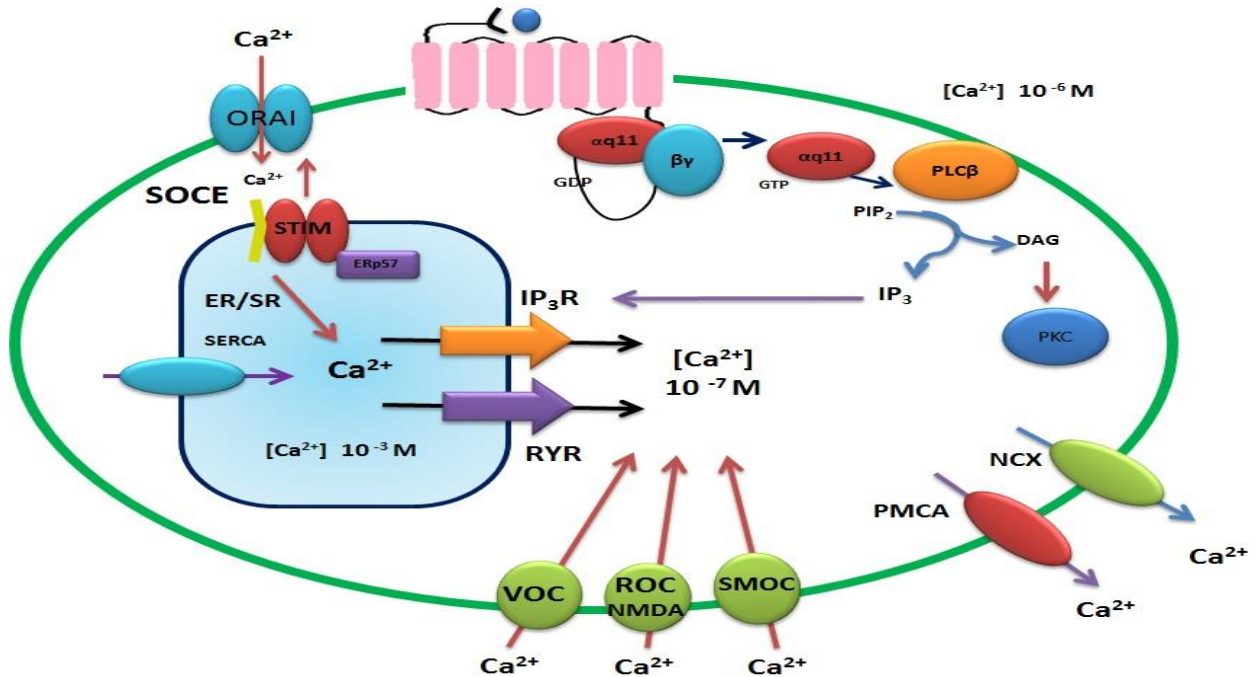


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de transporte y unión del Ca^{2+} que contribuyen a la homeostasis de este ión en la célula. Incluyen canales, bombas, transportadores, proteínas de unión a Ca^{2+} . El sistema reticular es el depósito de Ca^{2+} más importante de la célula.

REMOCIÓN DE Ca^{2+} DEL CITOSOL

Tanto la membrana plasmática como la membrana del RE, están dotadas de bombas iónicas con la capacidad de remover Ca^{2+} del citosol. La bomba SERCA es responsable de la recaptura de éste ion al lumen del RE, pertenece a la clase de ATPasas tipo-P, ya que utiliza la energía del ATP para conducir Ca^{2+} a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración, por formación de un intermediario de alta-energía acilfosfato con una estequiometría de 2:1 Ca^{2+}/ATP (Krebs y cols., 2015). Basado en la teoría clásica E1/E2, donde la alta afinidad de unión a Ca^{2+} ocurre en estado E1, el lado del citoplasma; mientras que el sitio de baja afinidad para el ión representa el estado E2, que es el lumen del RS/RE (Bublitz y cols., 2013)

La bomba de Ca^{2+} ATPasa (PMCA) de la membrana plasmática es la responsable del ajuste fino del nivel del Ca^{2+} en la célula. El Ca^{2+} es bombeado a través de la membrana con una

estequiometría 1:1 Ca²⁺/ATP. La actividad de la PMCA es regulada de muchas formas. El más importante regulador de PMCA es la calmodulina, la cual interactúa directamente con PMCA. Al igual que la bomba SERCA, PMCA también pertenece a la clase de las ATPasas tipo-P, formando un intermediario acil-fosfato de alta energía, a expensas del consumo de ATP. Los cambios conformacionales ocurren durante el ciclo de reacción, distinguiéndose al menos dos diferentes estados conformacionales, E1 y E2. Calmodulina es el mayor activador de PMCA, pero en ausencia de calmodulina, el dominio de unión a calmodulina interactúa con dos receptores dentro del dominio catalítico de la bomba, el cual mantiene la enzima en un estado inhibido (Strehler y cols., 2007).

En adición la membrana plasmática contiene un sistema de transporte activo secundario Na⁺ dependiente, conocido como intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), con la capacidad de mover un ion Ca²⁺ hacia el exterior de la célula por 3 iones de Na⁺ que ingresan al citosol; es un sistema de transporte de baja afinidad por Ca²⁺, pero con alta capacidad de transporte. El NCX puede cambiar su dirección de transporte si el gradiente de Na⁺ disminuye y/o el potencial de membrana se vuelve menos negativo y en consecuencia introducir Ca²⁺ a la célula. Está constituido por nueve segmentos transmembrana y se han descrito 3 isoformas NCX1, NCX2 y NCX3 (Kimura y cols., 2009).

BUFFERS DE Ca²⁺ Y SENSORES DE Ca²⁺

En el lumen de las reservas intracelulares, grandes cantidades de Ca²⁺ son neutralizadas por la unión a proteínas tales como calsecuestrina o calreticulina, que son diferentes de las unidas a proteínas en el citosol como son la parvalbumina, calbidina o también llamadas proteínas S100 (Marenholz y cols., 2004).

COLÁGENO

El colágeno es la proteína individual más abundante en el cuerpo humano (constituye el 30% de las proteínas). (Ricard-Blum y Ballut, 2011). La familia de las colágenas comprende 28 miembros ordenados por números romanos (I-XXVIII). Son las proteínas más abundantes de la matriz extracelular. Se compone de 3 cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α, numeradas con número arábigo. Su diversidad se debe a la existencia de varias isoformas moleculares para el mismo tipo de colágeno (ejemplo colágeno tipo IV y VI) y a la composición de isoformas híbridas de la cadena alfa pertenecientes a dos tipos de colágeno diferente (moléculas tipo V / XI) (Ricard-Blum y Ballut, 2011). Sus efectos se han descrito sobre la regulación de la proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular. Las células interactúan con la matriz extracelular

tanto mecánica como químicamente, lo que produce notables efectos sobre la arquitectura tisular. La familia de las colágenas se dividen en dos grupos principales: proteínas fibrosas que son las más abundantes y conforman el elemento estructural en la piel, huesos y cartílago; a este grupo pertenecen los tipos: I, II, III, V y XI. Por otro lado, las proteínas no fibrosas que participan en la formación de la membrana basal, miofibrillas, a este grupo pertenecen los tipos: IV, VII, VIII, X, XIII y XVIII (Gistelink y cols., 2016).

Los colágenos fibrilares son los colágenos más abundantes en vertebrados donde juegan un papel estructural contribuyendo a la arquitectura molecular, de forma, y propiedades mecánicas de tejidos tales como la resistencia a la tracción en la piel y la resistencia a la tracción en los ligamentos (Kadler, 1995). Varios colágenos, una vez que se conoce como colágenos "menores", son cruciales para la integridad de los tejidos a pesar de que están presentes en cantidades muy pequeñas. El colágeno IX comprende 1% del colágeno de cartílago articular adulto y el colágeno tipo VII, crucial para la integridad de la piel, constituye sólo alrededor de 0.001% de colágenos totales (Martel-Pelletier y cols., 2008). El colágeno interactúa con células a través de varios receptores, y su función en la regulación del crecimiento celular, diferenciación, y migración a través de la unión de sus receptores está bien documentada (Ricard-Blum y Ballut, 2011).

El colágeno tipo I es la proteína más abundante en mamíferos. Tiene excelentes propiedades mecánicas y está presente en prácticamente todos los tejidos extracelulares con función mecánica. La unidad básica del colágeno tipo I es el tropocolágeno. Una triple hélice formada a partir de tres cadenas polipeptídicas, producto de dos genes que codifican para la pro-COL1A1 y pro-COL1A2, los cuales están localizados en el brazo largo del cromosoma 17. Para el gen COL1A1, que fue utilizado en este estudio, su tamaño es de 18 Kb y consiste en 52 exones. Las cadenas polipeptídicas codificadas a partir de estos genes son de aproximadamente 1000 residuos, la triple hélice se conforma de dos cadenas $\alpha 1$ de COL1A1 y una $\alpha 2$ de COL1A2, que comparten homología en la estructura primaria, ya que presentan repeticiones en tándem de la secuencia (Gly-X-Y), donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. El colágeno sufre modificaciones posteriores a la traducción, como pre procolágeno, se hidroxilan los residuos de prolina y lisina, para salir del retículo endoplásmico como pro colágeno, unir azúcares para poder ser secretada por fibroblastos y osteoblastos principalmente. Fuera de la célula se cortan los residuos N y C terminales para formar el colágeno de la matriz (Harjith y cols., 2011)

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

En el laboratorio de Medicina Experimental de la FMBUAP, se ha observado que la aplicación de histamina a cultivos primarios de fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN), causó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (figura 4). Posteriormente se realizó un estudio donde se analizaron mecanismos moleculares implicados en la señal de Ca^{2+} intracelular evocados por histamina.

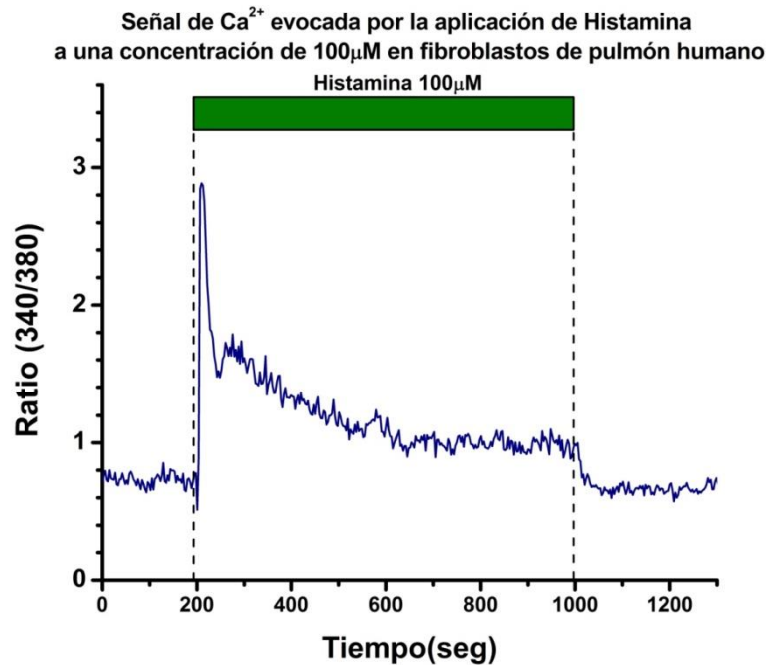


Figura 4. Registro de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en FPHN. El pico de la señal es debida a liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y/o entrada de Ca^{2+} extracelular, y la fase de decaimiento es debida a los mecanismos que remueven el $[Ca^{2+}]_i$ por: SERCA, NCX y PMCA y a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

En este estudio se reportó que la concentración de $100\mu M$ de histamina incrementó las $[Ca^{2+}]_i$ en el 96% de las células estimuladas. Se observó además que la histamina emplea la vía del IP_3 para la liberación de Ca^{2+} , ya que la respuesta fue abolida cuando la actividad de la PLC fue inhibida por U73122 (Romano Bernabe y cols., 2012). La PLC hidroliza los fosfolípidos de membrana, generando 2 segundos mensajeros (IP_3 y DAG) el IP_3 dispara la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. Se encontró que esta liberación fue completamente inhibida por el antagonista de los receptores de IP_3 llamado 2-APB. Reafirmando la idea de que la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares es mediada por receptores sensibles a IP_3 provocando un incremento en las $[Ca^{2+}]_i$ evocadas por histamina. Estos resultados fueron consistentes con

estudios previos realizados en células gástricas enterocromafines y fibroblastos gingivales (Niisato y cols., 1996)

Sin embargo, aún se desconoce si ésta señal de Ca²⁺ está relacionada con la proliferación celular e incremento de colágena inducida por histamina en fibroblastos de pulmón humano.

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LOS FENÓMENOS DE FIBROPROLIFERACION

La fibrosis, es una característica notable del tejido crónicamente inflamado, como consecuencia de la acumulación progresiva y excesiva de colágeno de la matriz extracelular secundaria al aumento de la proliferación de fibroblastos (la principal célula mesenquimal responsable de la síntesis de colágeno intersticial). Una característica del tejido pulmonar de pacientes con enfermedad pulmonar fibrótica es un aumento del número de mastocitos, muchos de los cuales están en un estado de degranulación parcial situado en las proximidades de la proliferación de fibroblastos (Cairns y Walls, 1997).

Los fibroblastos son células mesenquimales ubicuas que se encuentran normalmente en el estroma de muchos tejidos. Son células no excitables, que producen una amplia variedad de proteínas de la matriz extracelular (MEC) y mediadores bioquímicos como factores de crecimiento y proteasas. En el pulmón adulto normal, están presentes en la adventicia de las estructuras vasculares y de la vía aérea. Al igual que otros tejidos, son comúnmente cultivados como células adherentes exhibiendo una morfología de espiga y expresando colágena intersticial (tipo I y III), carecen de membrana basal y tienen proyecciones citoplasmáticas, contienen un núcleo oval, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gran cantidad de material citoplasmático granular, pero no expresan marcadores de otros tipos de células diferenciadas. Por lo tanto no hay ningún marcador para indicar que son un tipo distinto de células (Phan, 2008).

En particular estos fibroblastos pueden tener orígenes extrapulmonares, posiblemente migren al pulmón en respuesta a señales de daño pulmonar crónico y fibrosis. Algunas de éstas señales pueden ser citosinas (TNF- α , PDG, TGF- β) las cuales juegan un papel fundamental en la regulación de fibroblastos, circulación y extravasación a través de la superficie del lumen de las células epiteliales en sitios de inflamación tisular (Baker y Alvira, 2014).

Es generalmente aceptado que los miofibroblastos representan las células clave en la reconstrucción fisiológica de tejido conectivo después de un daño, y en la generación de formaciones de tejido patológico que caracteriza a la fibrosis. Además, basados en reciente evidencia que los elementos fibroblásticos tienen influencia considerable en la expresión génica de células epiteliales subyacentes, los miofibroblastos en los pulmones lesionados también

podrían tener un profundo efecto sobre la vía aérea adyacente y las células epiteliales alveolares, de modo que favorecen la promoción de la fibrosis (Phan, 2008).

Los fibroblastos son la principal fuente de macromoléculas extracelulares de la matriz de tejido conectivo. La migración y proliferación de fibroblastos en sitios inflamatorios son importantes procesos en la curación de heridas y desarrollo de fibrosis. Los mastocitos, distribuidos por todo el tejido conectivo, son efectores importantes en reacciones inflamatorias alérgicas. Recientemente, el papel de los mastocitos en la reparación de heridas y el proceso de remodelación ha estado atrayendo la atención. Un incremento en el número de mastocitos se ha encontrado en los pulmones de pacientes con fibrosis y en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Por otra parte, los mastocitos estimularon la migración y proliferación de fibroblastos en un modelo in vitro de curación de heridas. Estas observaciones sugieren que los mastocitos están implicados en el proceso de fibrosis. Estudios in vitro demostraron además que la histamina fue capaz de estimular la proliferación de fibroblastos de prepucio, la síntesis de colágeno y la migración de fibroblastos conjuntivales (Kohyama y cols., 2010).

La relación entre inflamación y fibrosis es complicada, pero ya existe mucha evidencia que sugiere que las células inflamatorias influyen en la fibrosis por liberación de mediadores fibrogénicos (Stramer y cols., 2007). En 1988 se realizó un estudio en cultivos primarios de fibroblastos humanos donde se observó que la histamina mejoró la proliferación fibroblástica de una manera dosis dependiente, con un efecto óptimo a una concentración de 10^{-7} mol/l, la proliferación ocurrió cuando las células fueron expuestas por periodos de tiempo restringido durante el crecimiento y se observó que esto dependía en parte del estadio del ciclo celular alcanzado por los fibroblastos. La histamina indujo proliferación mediada a través de los H1R en los fibroblastos. Concluyendo que productos de mastocitos como la histamina pueden interactuar y promover el incremento de la proliferación de fibroblastos encontrados en la fibrosis pulmonar (Jordana y cols., 1988).

En 1999 Leonardi y cols., realizaron un estudio donde estimularon fibroblastos conjuntivales normales y de queratoconjuntivitis vernal (QCV, un tipo de conjuntivitis atópica) con histamina en presencia de antagonistas H1 y H2, el efecto fue evaluado a través de la medición de la proliferación, migración y medición de procolágeno tipo I y III (PIP). Observaron que los fibroblastos derivados de QCV proliferaron con un índice mayor que los fibroblastos conjuntivales normales en ausencia de histamina, después de la estimulación con histamina ambos cultivos crecieron a un ritmo similar. Tanto los antagonistas H1 como los H2 inhibieron la proliferación

inducida por la histamina de una manera significativa. Sin embargo los fibroblastos de QCV fueron más sensibles a la histamina produciendo más PIP que los fibroblastos normales. Concluyendo que la capacidad proliferativa de los fibroblastos de QCV puede ser el resultado de un crecimiento selectivo de una o más subpoblaciones de fibroblastos en un tejido crónicamente inflamado (Leonardi y cols., 1999).

El mecanismo por el cual la histamina ejerce este fenómeno no se ha esclarecido aun, pero uno de los primeros estudios que explica uno de los mecanismos por el cual ésta molécula actúa es el reportado por Liang y cols. 2003, donde observaron en cultivos de miofibroblastos valvulares que la histamina a través de la activación de los H1R evocaba una señal de Ca²⁺, liberando este ion desde el compartimento del RE, pero no inducía la entrada del ion. Esta liberación de Ca²⁺ inducida por histamina fue oscilatoria y dependiente de la recaptura del ión al RE por la SERCA. Al aplicar CPA un bloqueador reversible de esta bomba, después de depletar el almacén de Ca²⁺ sensible a histamina revelaba la presencia de un segundo y más pequeño almacén de Ca²⁺ insensible a histamina en el RE. Otro efecto reportado del CPA fue la activación de los SOC, por lo tanto este estudio reportó en primera instancia una vía de señalización de Ca²⁺ inducida por histamina a través de los H1R (Liang y cols., 2003).

En otro estudio se analizó la expresión génica inducida por diversas concentraciones de histamina en fibroblastos humanos normales derivados de piel y mucosa nasal, se observó un aumento en la expresión de colágeno tipo I en los fibroblastos tratados tanto con dosis elevadas (0.1mM y 1µM) como con dosis bajas de histamina de (1 pM). También se observó que la expresión de los genes derivados de los fibroblastos se expresó de manera distinta con diferentes concentraciones de histamina y que la potencia de la acción inhibitoria de los antagonistas de los H1R no es igual para los fibroblastos derivados de la piel que para los que derivan de la mucosa nasal (Murota y cols., 2008).

Kohyama y cols. 2010, realizaron un estudio in vitro con el objetivo de investigar el efecto de la histamina sobre la migración de fibroblastos de pulmón humano fetal (HFL-1). Observando que el efecto de la histamina se incrementaba con el tiempo. Este efecto estimulador de la histamina sobre la migración de HFL-1 fue inhibida por un receptor antagonista de H4R, JNJ7777120 (10⁻⁵M). Este estudio demostró el potencial de la histamina para estimular la migración de HFL-1. Concluyendo que esta molécula puede contribuir a la regulación de la cicatrización de heridas así como también estar implicada en el desarrollo de desórdenes fibróticos en el pulmón. (Kohyama y cols., 2010).

Veerappan y col. 2013, realizaron un estudio donde se observó que ratones genéticamente deficientes de células cebadas (MCD) presentaban protección a desarrollar fibrosis pulmonar inducida con bleomicina. Esta protección a desarrollar fibrosis desaparecía al retar a los ratones MCD con bleomicina después de restaurar sus células cebadas pulmonares (Veerappan y cols., 2013).

En otro estudio reciente se observó que la histamina indujo contracción del gel de colágeno de fibroblastos de pulmón humano. Y éste efecto estuvo mediado por H1R, esta señal fue inhibida por el bloqueador 2-APB de la vía de señalización de IP₃. El efecto de los antagonistas de los H1R y 2-APB estuvieron asociados con la inhibición del incremento de las concentraciones de [Ca²⁺]_i evocada por histamina (Horie y cols., 2014).

JUSTIFICACIÓN:

El asma y las enfermedades alérgicas son actualmente un problema de salud pública a nivel mundial. El asma es considerada la enfermedad crónica más común en la infancia. Existen múltiples tratamientos, pero hasta la fecha los corticosteroides inhalados siguen siendo el tratamiento más eficaz para el asma persistente. Sin embargo, aproximadamente un 10% de los pacientes con asma persistente, presentarán complicaciones relacionadas al daño producido sobre el epitelio de la vía aérea con la generación subsecuente de factores de crecimiento fibroproliferativos. Ya existe suficiente evidencia, donde se ha observado que la histamina promueve la proliferación de fibroblastos, contribuyendo así al desarrollo de desórdenes fibróticos en el pulmón. A pesar de éste conocimiento los antihistamínicos solo se recomiendan actualmente para el tratamiento del asma, cuando se encuentra relacionada con otras enfermedades atópicas y por lo tanto no están aprobados como tratamiento de primera línea. Permanece la interrogante si los antihistamínicos pueden ser benéficos para los pacientes asmáticos aún sin manifestaciones de enfermedad atópica. Por lo tanto, aclarar el efecto de los antihistamínicos, en la fisiopatogenia de la remodelación de la vía aérea puede ayudar a esclarecer el papel de estos medicamentos en el tratamiento del asma. En el laboratorio de medicina experimental de la BUAP se observó que la histamina evocó una señal de Ca²⁺ mediante la activación de la fosfolipasa C, la cual media la producción de IP₃ que induce la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares, en adición el vaciamiento de los almacenes intracelulares causa la apertura de canales de Ca²⁺ en la membrana celular que permiten la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular hacia el citoplasma. Sin embargo, aún no se tiene evidencia de que la inducción de ésta señal esté relacionada con el efecto de la histamina sobre la producción de colágena y proliferación de fibroblastos. En éste estudio mediante el empleo de bloqueadores específicos de la señal de Ca²⁺ se investigó, si esta señal inducida por histamina, está relacionada con su efecto fisiológico. Esta caracterización contribuirá a la identificación y a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares; a través de los cuales la histamina genera la producción de colágeno en la matriz extracelular y por lo tanto del mecanismo de acción del proceso de remodelación pulmonar (fibrogénesis), lo que a largo plazo impactará en el desarrollo de abordajes terapéuticos más efectivos para el control y prevención de esta enfermedad, que afecta profundamente la calidad de vida de los pacientes con fibrosis pulmonar secundaria a asma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se cuenta con evidencia suficiente del efecto proliferativo de la histamina sobre diferentes tipos de células. Específicamente sobre fibroblastos, se ha demostrado que la histamina tiene el potencial de estimular su migración, proliferación y por consiguiente el incremento en la producción de fibras de colágeno contribuyendo así al desarrollo de desórdenes fibróticos en diferentes tipos de tejidos. Sin embargo, los mecanismos fisiopatogénicos a nivel molecular que desencadenan la fibrosis subepitelial no se conocen con precisión. No se ha encontrado en la literatura médica un estudio que aborde con claridad tal mecanismo por el cual la histamina ejerce este efecto sobre fibroblastos de pulmón humano, así como también el papel que desempeña sobre la señal de Ca²⁺ intracelular y su efecto directo en la proliferación e incremento en la producción de colágeno, surgiendo la siguiente pregunta de investigación:

¿La histamina causa proliferación y expresión de colágeno en FPHN a través de la activación de la vía de señalización de Ca²⁺?

HIPÓTESIS

La histamina incrementa la proliferación y expresión de colágeno en fibroblastos de pulmón humano normal a través de la vía de señalización de Ca²⁺ intracelular

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proliferación y expresión de colágena inducida por histamina en FPHN es mediada por la vía de señalización de Ca²⁺.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Estudiar el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión de colágena en FPHN.

Objetivo específico 2: Estudiar el efecto de la inhibición de los receptores H1 y H2 sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Objetivo específico 3: Estudiar el efecto de la inhibición de la PLC sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Objetivo específico 4: Estudiar el efecto de la inhibición de los receptores a IP₃ sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Objetivo específico 5: Estudiar el efecto de la inhibición de la bomba de Ca²⁺ del RE (SERCA) sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Objetivo específico 6: Estudiar el efecto de la inhibición de los canales de Ca²⁺ operados por los SOC sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Comparativo, Experimental, Transversal, Prolectivo, Homodémico.

UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el apoyo y colaboración del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Enfermedades Respiratorias (INER) de la ciudad de México.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se incluyeron las líneas celulares obtenidas por donación de pacientes de cualquier sexo y edad, con diagnóstico de muerte cerebral secundaria a cualquier causa, sin antecedente de patología pulmonar, tabaquismo, alergia o atopia reportado por la historia clínica en el expediente y que además tuvieron resultado histopatológico de biopsia pulmonar reportado como normal.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Obtención de cultivos de fibroblastos no estables.

Se excluyeron líneas celulares que presentaron un tiempo medio de duplicación mayor a 72 horas.

Líneas celulares que se contaminaron durante el estudio o que no presentaron confluencia temprana de más del 80%.

DEFINICIÓN DE LA VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICION:**TABLA 1. VARIABLES DE MEDICIÓN**

VARIABLE	ESCALA	MEDICION	VALOR
Proliferación celular	Dimensional/Continua	Kit comercial CCK-8 o WST-1	Número de células en relación al control.
Expresión de Colágena	Dimensional/Continua	Advantage RT- <i>for</i> -PCR	Número de copias por μL^{-1} en relación al control.
Bloqueadores de los receptores de Ca ²⁺	Nominal Dicotómica	Kit comercial CCK-8	Presencia/ausencia

METODOLOGÍA GENERAL PARA TODOS LOS OBJETIVOS**PREPARACIÓN DE MEDIO PARA CULTIVO DE FIBROBLASTOS**

Previa asepsia del material y radiación en UV por 30 minutos. En un vaso de precipitado en el agitador magnético con 900 ml de agua desionizada esterilizada, se administraron los componentes en la siguiente orden: Nutrimix Ham F-12, bicarbonato de sodio 1.176 gramos y 10 ml de antibiótico. Se ajustó pH a 7.4 de la solución con el potenciómetro previamente calibrado. Posteriormente se filtró con técnica estéril conectando el equipo de filtración al succionador. Para preparar medio con suero, a la dilución deseada se agregó el suero fetal bovino para ser filtrado en el medio de la misma forma, previa inactivación del SFB. Se incubó medio con suero y sin suero para descartar contaminación durante el proceso y se dio por terminado el procedimiento.

TÉCNICA PARA EL CULTIVO DE FIBROBLASTOS.

La muestra de pulmón de aproximadamente 1 X 1 cm se colocó en una caja Petri, con tijeras iris se realizaron cortes repetidos por aproximadamente 10 minutos, se resuspendió el tejido con 10 ml de medio sin SFB y se llevó a tubo Falcón, se agregaron 10 ml de tripsina, agitando cada 5 minutos por 20 minutos, se detuvo la reacción de tripsina con 20 ml de medio con SFB, se resuspendió y extrajo el contenido para filtrar en un tubo Falcón colocando una gasa estéril. El contenido obtenido se centrifugó a temperatura de 37 GC, 200 g por 10 minutos, posteriormente se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 5 ml de medio Ham F-12 con SFB, se colocó 2.5 ml de en caja petri de 3mm de diámetro o los 5 ml en una caja T-25. Cambiando el medio cada tercer día. La temperatura para su óptimo crecimiento fue de 37 °C en una atmosfera de 95 % aire y 5 % de bióxido de carbono hasta alcanzar confluencia, las células

fueron utilizadas para los experimentos a partir del pase 5 hasta el pase 12 o se congelaron en nitrógeno líquido.

TÉCNICA PARA LA PROPAGACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Una vez que las células se encontraron en confluencia de más del 80%, se propagaron con técnica estéril, se colocó el material en rayos UV por 30 minutos. Se retiró el medio HAM F-12 con suero fetal bovino que contenían las cajas T-25, se lavó con PBS, y posteriormente se aplicó tripsina-EDTA 2 ml, se incubó durante 1 minuto observando al microscopio que las células se despegaran de la superficie, realizando movimientos suaves de agitación para favorecer el desprendimiento de las células. Posteriormente esta reacción es inhibida con medio HAM F-12 con suero fetal bovino, se resuspendió el contenido y se pasó a un tubo falcon. Se centrifugó a una temperatura de 37°C, a 1800 rpm durante 10 minutos, posteriormente se aspiró sobrenadante dejando solo el pellet. Posteriormente se agregó 10 ml de medio HAM F-12 con SFB y se resuspendió. Se transfieren células a dos cajas T-25 a partes iguales. Cambiando medio cada tercer día hasta que las células alcanzaran confluencia temprana de más de 80% para nuevamente ser propagadas exponencialmente.

TÉCNICA PARA CONGELACIÓN DE FIBROBLASTOS

Para congelar se extrajo el medio de cultivo de las cajas y se adicionaron 1 a 2 ml de tripsina 1 durante un minuto aproximadamente, observado al microscopio, hasta que las células se despegaron de la superficie de la caja, una vez despegadas de la superficie se agregaron 3 a 4 ml de medio Ham F-12 con suero fetal bovino al 10% para inactivar la tripsina. Se pasaron células a un tubo falcon, se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de SFB más 10µL de DMSO. Las células se colocaron en un criotubo, para ser almacenado a -70°C durante 1 día y posteriormente se preservan en nitrógeno líquido para volver a ser utilizadas posteriormente.

TÉCNICA PARA REALIZAR PROLIFERACIÓN CELULAR WST-1 ó CCK8

Se utilizó técnica de proliferación celular con WST-1 y CCK8. La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazán) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta mide la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica es sensible, rápida y

sencilla, consta de los siguientes pasos; se retira el medio a cada pozo y se cambia por 100 μ L medio fresco agregando 10 μ L de CCK-8 ó WST, se realiza un nuevo plaqueo del medio a las dos horas de incubación con el reactivo en una placa ELISA de 96 pozos, observando el cambio de coloración lo cual indica mayor proliferación, mayor actividad mitocondrial y por ende mayor hidrólisis del reactivo. La lectura de la proliferación se realizó en un multilector ELISA (FilterMax F5, Multi-Mode Microplate Reader) a 450nm, eliminando toda burbuja, más tarde el resultado se traduce en número de células.

EXTRACCION DE RNAm TOTAL POR TECNICA DE TRIZOL

Se aisló el RNA a las 48 horas de incubadas las células con los respectivos reactivos, mediante la técnica de TRIZOL reagent (sigma-aldrich) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se retiró el medio de las cajas de 6 pozos, se agregó 1 ml de TRIZOL realizando homogenización con pipeteo suave, se dejaron reposar durante 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. La mezcla se transfirió a tubos eppendorff de 1.5 ml libres de RNAsas. Se añadió cloroformo 500 μ L por cada ml de TRIZOL y se agitó vigorosamente por 15 segundos en vortex. Se introdujeron en hielo por 3 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se separó la fase acuosa de las muestra en otro tubo de 1.5 ml y se agregó 0.5 ml de isopropanol al 100%, se centrifugó de nuevo a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente decantó el sobrenadante de los tubos para dejar solo el pellet y se agregó etanol al 75%. Las muestras se agitaron en un vortex y se volvieron a centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se decantaron las muestras y secaron a temperatura ambiente posteriormente se diluyó el RNA con 15 μ L de agua inyectable. La medición de RNAm se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Las muestras fueron almacenadas a -70°C para posteriormente realizar la RT-PCR.

RT-PCR

La cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue utilizada para medir la expresión de colágeno en FPHN. El RNAm total previamente extraído fue convertido a cDNA mediante una transcriptasa reversa con el Kid Strand cDNA Synthesis #K1632 Lot 00306591 almacenado a -20°C; realizando una mezcla por cada pozo en placas para PCR con el siguiente orden: Oligo(dT)₁₈ Primer 1 μ L, Random Hexamer Primer 1 μ L, 5X Reaction Buffer 4 μ L, RiboLock RNase Inhibitor 1 μ L, dNTP Mix 2 μ L, RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ L más 10 μ L de la muestra de RNAm, las condiciones del termociclador fueron: 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 25°C seguidos por 60 minutos a 42°C. Una vez obtenido el cDNA se realizó PCR, preparando una solución por muestra de Master Mix 2x 5 μ L, sonda

TaqMan 60X marcada con FAM 0.166 μ L (Hs00164004_ml para colágeno tipo I) y agua libre de RNAsas 0.834 μ L más 4 μ L de la muestra de cDNA. Los niveles de genes de colágeno fueron estandarizados contra un gen Pol-2A utilizado como control interno. Las condiciones del termociclador (Life Technologies QuantStudio Flex 7) fueron: 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y posteriormente 1 minuto a 60°C. Todas las RT-PCR fueron realizadas por triplicado en al menos 3 ocasiones. Los resultados fueron calculados con la diferencia del gen de colágeno y el gen de referencia.

METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO

Objetivo específico 1: Estudiar el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: En un estudio reciente se observó que la histamina indujo la contracción de gel de colágeno en fibroblastos de pulmón humano (Horie y cols., 2014). Pero hasta la fecha no se han reportado estudios que aborde el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión de colágeno en fibroblastos de pulmón humano y el mecanismo por el cual se lleva a cabo éste efecto. En la Facultad de Medicina de la BUAP se llevó a cabo un estudio donde se investigó la señal de Ca²⁺ inducida por histamina en FPHN, se realizó una curva de concentración-respuesta a histamina llegando a la conclusión que la dosis máxima de histamina que generó una respuesta en el incremento de Ca²⁺ intracelular en el 96 % de las células estimuladas fue de 100 μ M (Romano Bernabe y cols., 2012).

Metodología: De acuerdo a los estándares de laboratorio y a la técnica estandarizada de proliferación, los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 en confluencia temprana a placas de 48 pozos, con concentraciones celulares de 15×10^3 , 20×10^3 , 25×10^3 y 30×10^3 células por pozo para la elaboración de la curva de calibración y para el resto de las condiciones experimentales se trabajó con 15×10^3 células. Las condiciones experimentales fueron: control, histamina 100 μ M y medio con SFB al 10%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para los experimentos de extracción del gen de colágeno las células se transfirieron a cajas de 6 pozos, la extracción de RNA se realizó con técnica de TRizol y posteriormente se realizó RT-PCR. La medición de proliferación y extracción de RNA se realizó a las 48 horas de incubadas las células con los estímulos correspondientes.

Objetivo específico 2: Estudiar el efecto de la inhibición de los receptores H1 y H2 sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: Se han descrito hasta el momento 4 receptores de histamina (H1R a H4R) para los cuales la histamina es el agonista específico. En estudios previos se ha observado que la histamina actúa en FPHN principalmente a través de los H1R y H2R acoplados a GPCRs ya que presentan desensibilización homóloga. En la actualidad se encuentran en el mercado antagonistas específicos para cada uno de estos receptores; difenhidramina para los H1R, ranitidina para los H2R, clobenpropitandol para los H3R y JNJ7777120 para bloquear los receptores H4. En estudios realizados previamente se ha observado que la histamina ejerce su efecto en fibroblastos primordialmente a través de los receptores H1 y H2. Por lo que en éste experimento sólo se bloquearon los H1R y H2R.

Metodología: De acuerdo a los estándares de laboratorio, los fibroblastos que se encontraron en cajas T-25 en confluencia de más del 80%, fueron transferidos a placas de 48 y 6 pozos, Las células fueron pre incubadas a 37 °C pirilamina 1 µM y otras 10 µM por 20 minutos y posteriormente se aplicó el estímulo de histamina 100 µM, los experimentos de proliferación y extracción de RNAm se realizaron a las 48 horas de incubadas las células con los estímulos.

Objetivo específico 3: Estudiar el efecto de la inhibición de la PLC sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: Actualmente se sabe que la histamina interactúa a nivel celular mediante GPCRs activando PLC, una vez que la PLC es activada hidroliza un fosfolípido de membrana, generando dos segundos mensajeros: IP₃ y DAG, el IP₃ unido a receptor dispara la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares. En estudios previos se ha observado que la histamina emplea esta vía del IP₃ para la liberación de Ca²⁺ intracelular, ya que la respuesta es abolida cuando la actividad de la PLC es inhibida por U73122. Esto fue consistente con otros estudios, donde se reportó que la histamina evocó una respuesta de movilización de Ca²⁺ intracelular mediada por la vía del IP₃, como segundo mensajero en otros tipos de células (Bird y Walker, 1998).

Metodología: Los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 a placas de 48 y 6 pozos. Posteriormente las células fueron pre incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de PLC U73122 y con el análogo inactivo U73343 ambos a dosis de 10 µM por 20 minutos. En presencia de éstos fármacos se aplicó la dosis de histamina 100 µM, la lectura de absorbancia se realizó a las 48 horas de incubadas las células, así como el aislamiento de RNAm para realizar RT-PCR.

Objetivo específico 4: Estudiar el efecto de la inhibición de los receptores de IP₃ sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: Desde su introducción en el estudio de la vía de señalización del Ca²⁺, el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) ha sido utilizado en muchos estudios para probar la implicación de los IP₃R en la generación de la señal de Ca²⁺. Su principal efecto antagónico es a través del ingreso de Ca²⁺ más que a influir en su liberación. Sin embargo, 2-APB ha sido adoptado como un antagonista de los receptores de IP₃ (IP₃R) (Bootman y cols., 2002).

Metodología: Para estudiar la participación del IP₃, evocado por histamina se utilizó 2-APB, que es un bloqueador de los IP₃R. Bajo los estándares de laboratorio, los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 a placa de 96 y 6 pozos. Las células se pre incubaron con 2-APB a dosis de 50 μM, durante 20 minutos a 37°C en medio libre de Ca²⁺, posteriormente se aplicó la dosis máxima de histamina, la medición de proliferación y extracción de RNAm se realizó a las 48 horas de incubadas las células.

Objetivo específico 5: Estudiar el efecto de la inhibición de la bomba de Ca²⁺ del RE sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: En estudios previos se ha observado que no hay señal de Ca²⁺ después de agotar los reservorios de Ca²⁺ intracelular con ácido ciclopiazónico (CPA), el cual es un inhibidor de la SERCA que impide que el Ca²⁺ sea recapturado nuevamente al RE, lo cual conlleva a su depleción en el citosol.

Metodología: Bajo los estándares de laboratorio, los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 a placas de 48 y 6 pozos. Las células fueron pre incubadas con CPA 10 μM por 20 minutos, posteriormente se aplicó la dosis de histamina 100 μM, los experimentos de proliferación y extracción de RNAm para determinación del gen de colágeno mediante RT-PCR se realizaron a las 48 horas de incubadas las células.

Objetivo específico 6: Estudiar el efecto de la inhibición de los canales de Ca²⁺ operados por almacén (SOC) sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN.

Fundamento lógico: En el experimento realizado previamente en esta Facultad, se llegó a la conclusión de que la señal de Ca²⁺ evocada por histamina depende del ingreso de éste ion del medio extracelular, lo que llevó a investigar las vías que permiten el ingreso de Ca²⁺ a la célula. Se observó que la histamina generó dos tipos de respuesta sostenida (meseta y oscilaciones), que en presencia de 2-APB (bloqueador selectivo de los SOC) causó una

depresión de la fase de meseta y un bloqueo de las oscilaciones, lo cual revirtió después de la remoción de 2-APB, Indicando que la fase de meseta y oscilaciones dependen de la entrada de Ca²⁺ del medio extracelular, y que esta entrada de Ca²⁺ se da principalmente a través de los canales operados por almacén intracelulares (SOC) (Romano Bernabe y cols., 2012)

Metodología: Los fibroblastos fueron transferidos de caja T-25 una vez que se encontraron en confluencia de más del 80% a caja de 48 y 6 pozos. Las células se pre incubaron por 20 minutos con 2-APB 50 μ M en presencia de éste fármaco se aplicó la dosis máxima de histamina 100 μ M. Se usaron dos inhibidores adicionales ya conocidos de los SOC cationes trivalentes llamados lantano (La³⁺) y gadolinio (Gd³⁺). Las mediciones correspondientes se hicieron a las 48 horas de incubadas las células.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se procesaron en Excel y en el software SPSS versión 23. El análisis se describieron medias y desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados con estadística paramétrica, se reportaron promedios y DE, se utilizó la prueba estadística *t* de Student para análisis de muestras independientes y para comparación entre grupos ANOVA con prueba post hoc de Dunnett para comparación con el grupo control, y $p < 0.05$.

INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA

Este estudio de investigación fue realizado por la estudiante de Maestría en Ciencias Médica e Investigación, bajo la tutoría del D.C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros y bajo la co-tutoría del D.C. Roberto Berra Romani.

Dicha investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Experimental, con el apoyo del Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la BUAP, en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Enfermedades Respiratorias de la ciudad de México. Bajo el financiamiento de la BUAP.

ASPECTOS ETICOS

El presente estudio de investigación siguió los lineamientos éticos establecidos por los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, informe Belmont, Ley General de salud en materia de investigación para la salud y el Reglamento para la investigación en seres humanos capítulo VI (artículo 59 y 60), capítulo III (artículo 74) de la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos. Así como lo establecido en el título 14 de la Ley General de Salud y su reglamento en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos. Así mismo nuestra investigación se apega a los lineamientos de la Ley Estatal de Salud del Estado de Puebla (artículos 85, 86, 87, 88 y 89), y del título sexto que hace referencia al control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos en su capítulo I siguiendo los postulados de los artículos 90 y 91, el capítulo II de órganos y tejidos (artículos 101, 103, 106 y 110).

Se elaboró carta de consentimiento informado debidamente estructurado en base a los lineamientos de la Ley General de salud (artículos 324, 325, 326 y 327). De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (inciso 4.3) en materia de investigación, al documento escrito, signado por el investigador principal, el paciente o su familiar, tutor o representante legal y dos testigos, mediante el cual el sujeto de investigación aceptó participar en una investigación (en éste caso toma de tejido pulmonar de donante fallecido) una vez que recibió la información suficiente, oportuna, clara y veraz sobre los riesgos y beneficios esperados posterior a la toma de muestra. Los datos obtenidos en dicho consentimiento se manejaron de manera confidencial, salvaguardando la privacidad y la dignidad del donador y sus familiares.

El protocolo fue sometido a revisión para su aprobación por parte del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la BUAP y fue registrado en la secretaría con los siguientes datos

Fecha de registro: 23 de Noviembre de 2015

Número de libro: 2

Número de hoja: 15

Número de registro: 384

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN

La estandarización de la técnica de proliferación celular mediante la técnica con WST-1 y CCK-8 se realizó de la siguiente manera. Los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 una vez que se encontraron en confluencia temprana de más del 80%, a cajas de 96 pozos, en concentraciones celulares de 5×10^3 , 10×10^3 , 15×10^3 , 20×10^3 y 25×10^3 células por pozo, para realizar curva de calibración, para el resto de los pozos sólo se colocaron 5×10^3 células para realizar los experimentos, se dejaron las células en incubación por una noche en medio Ham F-12 con SFB al 10% y al día siguiente se cambió el medio para colocar las condiciones experimentales, también se realizó la medición basal y la curva de calibración, la cual fue aceptable cuando la R^2 era mayor de 0.95. Se observó que la curva perdía linealidad cuando el número de células por pozo era mayor de 20×10^3 (figura 5).

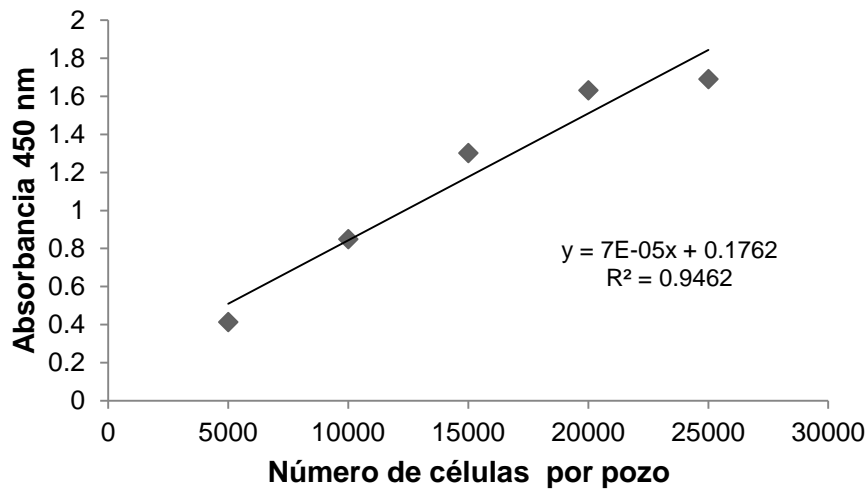
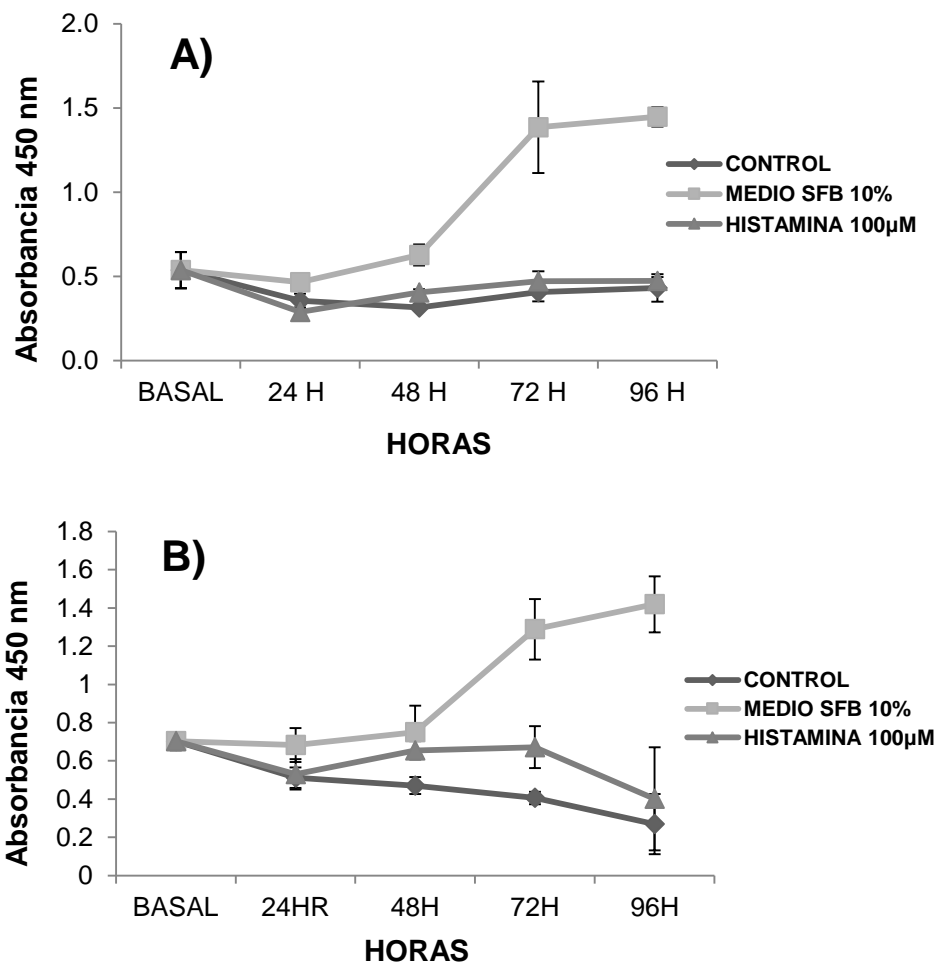


Figura 5. Curvas de calibración celular con concentraciones celulares de 5×10^3 , 10×10^3 , 15×10^3 , 20×10^3 y 25×10^3 por pozo. Línea NOVA P: 10, las células fueron transferidas de cajas T-25 en confluencia temprana a caja de 96 pozos, la medición de la proliferación se realizó mediante ensayo colorimétrico con CCK-8 dejando incubadas las células con el reactivo por 2 horas, con ayuda de un multilector a 450 nm, curva con R^2 menor de 0.95 B) Línea NOVA P: 11 curva de calibración células con concentraciones celulares no mayores de 20×10^3 .

Posteriormente las mediciones de proliferación fueron realizadas a las 0 horas (basal), 24, 48, 72 y 96 horas con 3 condiciones experimentales : control (con medio + SFB al 0.5%), histamina 100 μ M y medio con SFB 10%, por triplicado por cada condición. La lectura de proliferación celular se realizó en un multilector FILTER MAX FS a 450nm con la técnica colorimétrica ya mencionada en la metodología. (figura 6). Con el fin de establecer el tiempo de medición para el resto de los experimentos y en base a lo reportado en la literatura por Jordana y cols., 1988, donde se reportó que el mayor efecto de la histamina sobre la proliferación de los fibroblastos fue después de las 38 a 48 horas de haber aplicado el estímulo; se realizaron las mediciones de proliferación y extracción RNA a las 48 horas, para el resto de los experimentos con los bloqueadores.



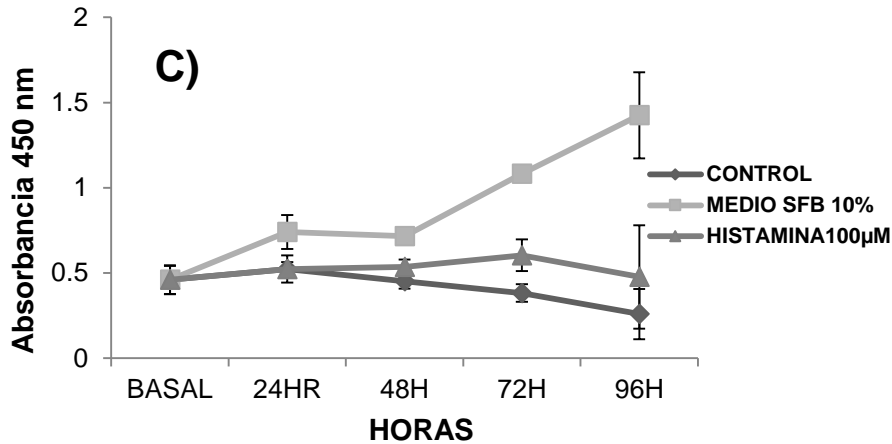


Figura 6. Experimentos diversos de proliferación con 3 condiciones: control, histamina y medio con SFB al 10%, la medición de la proliferación se realizó a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 96 pozos, incubadas por una noche, las condiciones experimentales se colocaron al día siguiente. La medición de proliferación se realizó mediante ensayo colorimétrico con 2 horas de incubación con CCK-8, en un multilector FILTER MAX FS a 450nm. A) Línea NOVA P: 9 B) Línea NOVA P: 10 y C) Línea FN-4-12 P: 9.

En estos experimentos observamos un comportamiento errático del control, con tendencia a la disminución de la proliferación conforme pasaban las horas, otro de los inconvenientes de estas condiciones experimentales fue la gran dispersión en los valores de las réplicas. Pensamos que esto era debido al tamaño de los pozos; otra de las condiciones que decidimos agregar fue el de sincronizar las células por 24 horas. Por lo cual en los siguientes experimentos, decidimos emplear pozos con una superficie mayor, aumentando la cantidad de células. Al igual que los experimentos en placas de 96 pozos se observó que la curva perdía linealidad (figura 7 A) cuando la concentración era mayor de 30×10^3 células por pozo. En la figura 7 se muestran los resultados de las curvas de calibración en placas de 48 pozos.

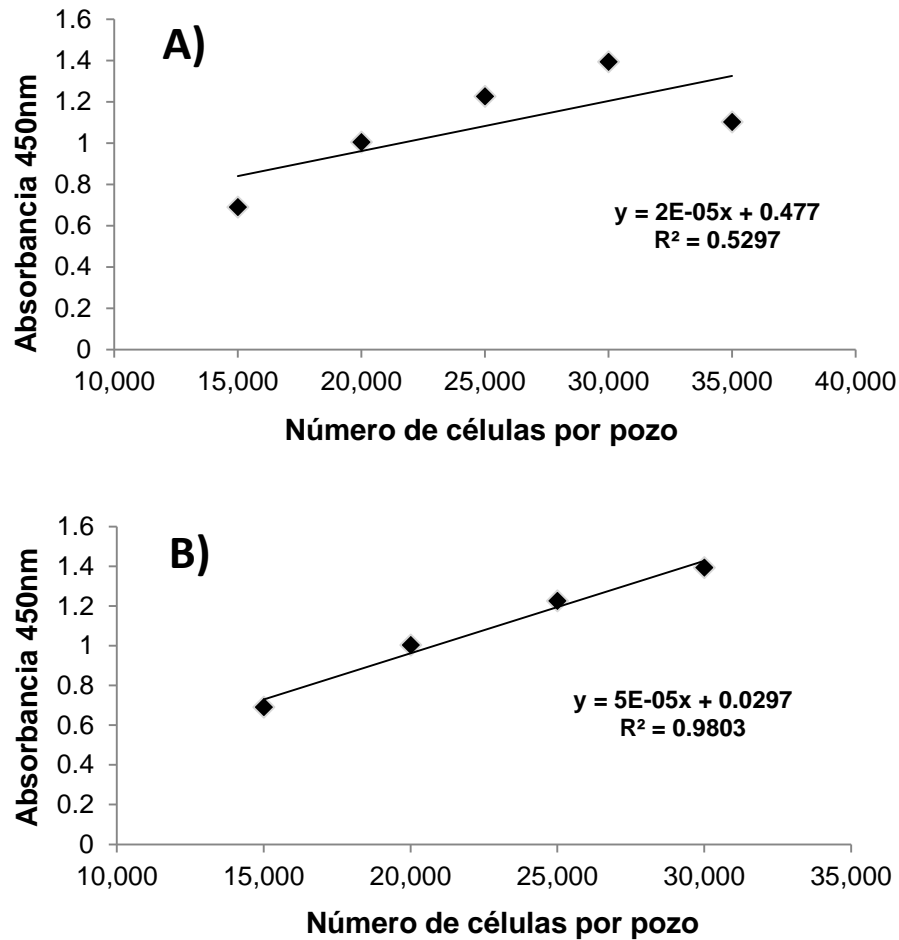


Figura 7. Curvas de calibración celular en diferentes líneas celulares. Se colocaron concentraciones celulares de 15×10^3 , 20×10^3 , 25×10^3 , 30×10^3 y 35×10^3 . Las células fueron transferidas de cajas T-25 en confluencia temprana a caja de 48 pozos, sincronizadas por 24 horas, la medición de la proliferación se realizó mediante ensayo colorimétrico con CCK-8 dejando incubadas las células con el reactivo por 2 horas, la absorbancia fue medida en un multilector a 450 nm. A) Línea NOVA P: 11 B) Línea NOVA P: 12, curva con concentración celular no mayor de 35×10^3 células por pozo

Siguiendo los pasos de la modificación de la técnica de proliferación, se realizaron experimentos por triplicado con 3 condiciones: control (medio Ham-F-12/SFB 1%), histamina $100\mu\text{M}$ y medio con SFB al 10%; las células se pre incubaron por 24 horas con medio sin suero con el fin de sincronizarlas; es decir que la mayoría de ellas estuviesen en G1 del ciclo celular. La celularidad en el control se mantuvo estable a las 48 horas de incubación, con una menor dispersión de los triplicados. La absorbancia fue menor que en los experimentos anteriores, probablemente por la sincronización lo que hace que las células estén metabólicamente menos activas (figura 8).

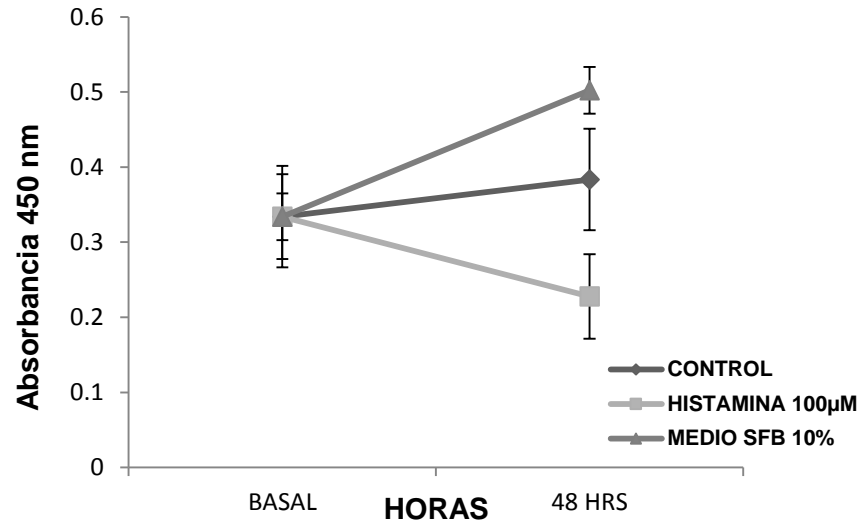


Figura 8. Experimento de proliferación celular con 3 condiciones experimentales: control, histamina 100µM y medio con SFB 10%, se realizó medición de absorbancia basal y a las 48 horas, Línea NOVA P: 9, las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 48 pozos, incubadas por una noche, los estímulos se colocaron a las 24 horas de haber sincronizado las células con medio sin suero, se utilizó ensayo colorimétrico mediante CCK-8 a las 48 horas de incubadas las células con los estímulos, en un multilector FILTER MAX FS a 450nm.

TECNICA DE PROLIFERACIÓN ESTANDARIZADA

- 1) Transferir de células en confluencia temprana de cajas T-25 a cajas de 48 pozos: con concentraciones celulares de 15×10^3 , 20×10^3 , 25×10^3 y 30×10^3 células por pozo para elaboración de la curva de calibración y para el resto de los experimentos colocar solo 15×10^3 células por pozo.
- 2) Plaquear con medio Ham-F12 con SFB al 10% y dejar incubando las células por una noche.
- 3) Sincronizar los cultivos celulares por 24 horas (con medio sin suero).
- 4) Colocar las condiciones experimentales con células sincronizadas y realizar medición la absorbancia basal y curva de calibración.
- 5) Utilizar como control medio Ham- F12 con SFB al 1%, el resto de las condiciones deberán ser diluidas con la misma condición que el control.
- 6) Medir proliferación celular a las 48 horas de incubadas las células, con CCK-8 dejando incubando las células con el reactivo por 2 horas.
- 7) Realizar absorbancia en un multilector a 450 nm.

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN

Con la técnica de proliferación ya estandarizada se probó el efecto de la histamina sobre la proliferación de los FPHN. Se observó que la histamina disminuyó la proliferación de los fibroblastos, al realizar prueba estadística t para muestras independientes se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p=0.037$ (figura 9).

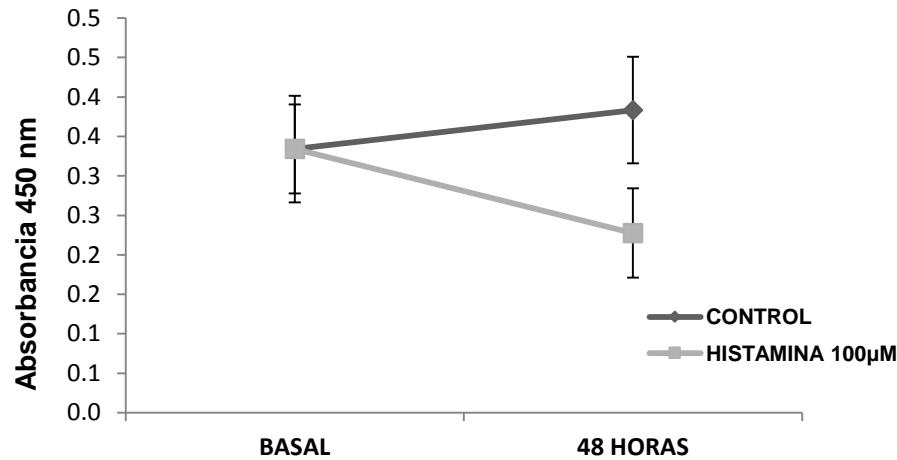


Figura 9. Efecto de la histamina sobre la proliferación de FPHN a las 48 horas. Línea NOVA P: 11 Los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 a cajas de 48 pozos, previo a la aplicación de las condiciones experimentales las células fueron sincronizadas por 24 horas, se realizó medición de absorbancia con ensayo colorimétrico con CCK-8. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos fueron analizados con prueba t para muestras independientes $p=0.038$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS RECEPTORES H1 Y H2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN

Para probar el efecto de los antagonistas de los receptores H1 y H2 sobre la proliferación en los FPHN se utilizó el antagonista de los H1R pirilamina y para bloquear a los H2R se utilizó cimetidina a dosis de 1 μ M y 10 μ M respectivamente.

Se observó que pirilamina no modificó la proliferación de los fibroblastos con respecto al control, el comportamiento de cimetidina fue similar al de pirilamina, ambos antagonistas inhibieron parcialmente el efecto de la histamina, ya que al realizar análisis de los datos con

ANOVA y prueba post hoc de Dunnett no se encontraron diferencias significativas, excepto en el grupo de histamina (figura 10).

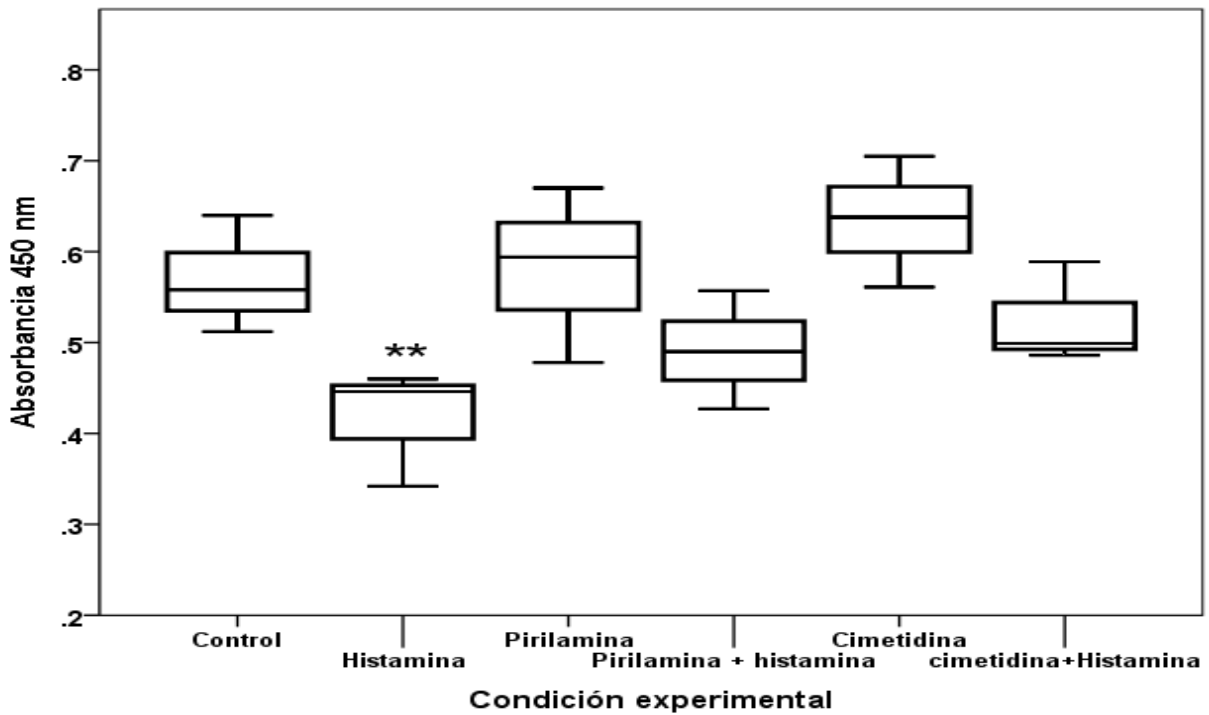


Figura 10. Efecto de la inhibición de los receptores de H1 y H2 sobre la proliferación de FPHN. Línea NOVA P: 12. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a placas de 48 pozos, previa sincronización por 24 horas, posteriormente se aplicaron las condiciones experimentales. La medición de la proliferación se realizó mediante técnica colorimétrica con CCK-8 en un multilector a 450 nm. Los datos fueron analizados con prueba estadística ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para comparación con el grupo control. Cada caja representa el rango intercuartílico (RI) de 3 mediciones de proliferación $**p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PLC SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN

Para estudiar el efecto de la inhibición de la PLC sobre la proliferación de los fibroblastos se empleó U73122 y su análogo inactivo U73343 ambos a dosis de 10 μ M.

Los resultados de proliferación con U73122 así como de U73343, no fueron interpretables debido a que éstos bloqueadores afectaron directamente la viabilidad de las células, corroborando por inspección visual en microscopio que la celularidad de los pozos estaba disminuida previo a la aplicación de CCK-8 (figura 11).

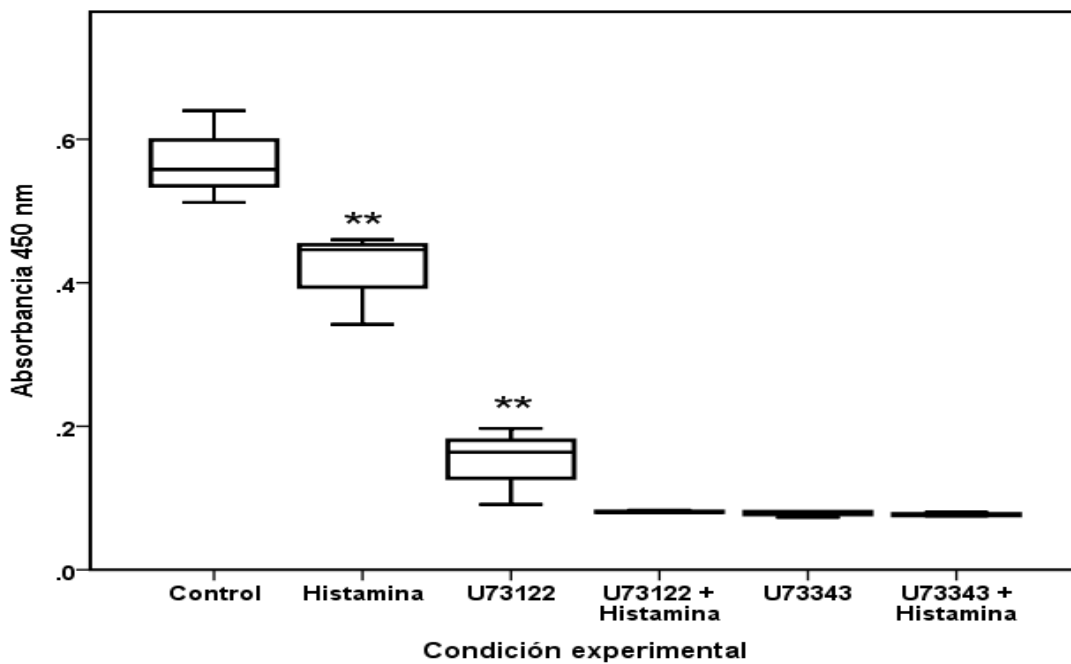


Figura 11. Efecto de la inhibición de la PLC sobre la proliferación en FPHN. Línea NOVA P: 12. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 48 pozos. La medición de proliferación se realizó mediante ensayo colorimétrico con CCK-8 a las 2 horas de incubación con el reactivo con ayuda de un multilector a 450 nm. Las gráficas de caja representan el rango intercuartílico de 9 mediciones de proliferación. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para diferencia entre grupos ** $p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SERCA SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN.

Para estudiar este objetivo se utilizó CPA un bloqueador selectivo reversible de la SERCA. Los resultados con CPA son poco interpretables ya que se observó que este bloqueador disminuyó la proliferación de los FPHN por sí mismo, de una manera estadísticamente significativa en relación al control ($p=0.002$), y en presencia de este bloqueador el efecto de la histamina no fue inhibido, estos datos nos sugieren que la histamina no ejerce su efecto a través de la inhibición de la SERCA (figura 12).

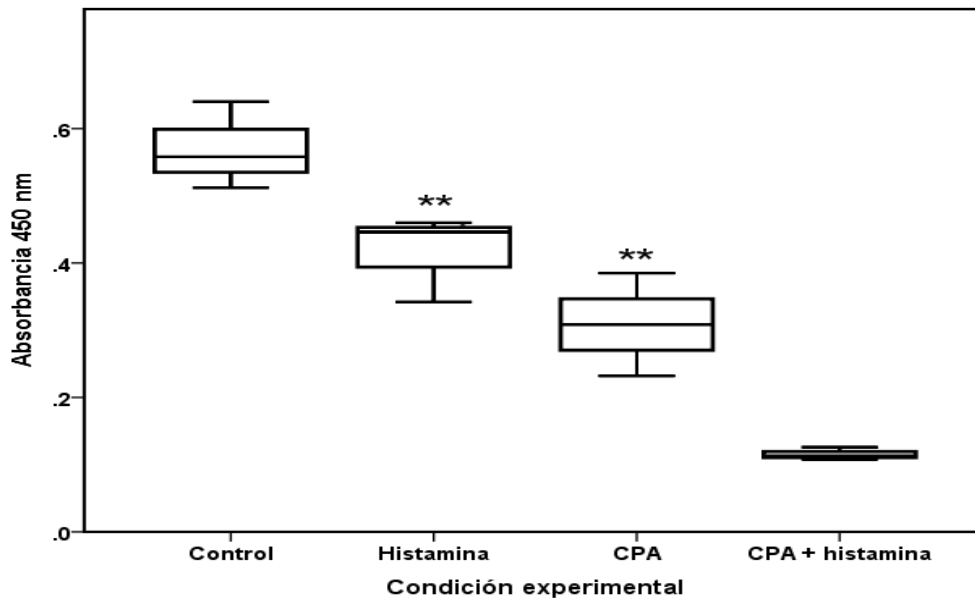


Figura 12. Efecto de la inhibición de la SERCA sobre la proliferación en FPHN. Línea NOVA P: 12. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 48 pozos. La medición de proliferación se realizó con ensayo colorimétrico con CCK8 a las 2 horas de incubación con el reactivo, en un multilector a 450 nm. Las cajas representan el rango intercuartilar de 3 mediciones de proliferación, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para diferencia entre grupos $**p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS SOC SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN FPHN.

Para inhibir a los SOC se utilizó 2-APB y otros dos bloqueadores llamados La³⁺ y Gd³⁺ ambos a dosis de 10µM.

Se observó que La³⁺ y Gd³⁺ no modificaron la proliferación de los FPHN; y en presencia de éstos bloqueadores el efecto de la histamina no fue inhibido, a excepción de 2-APB que sí parece bloquear parcialmente el efecto de la histamina; sin embargo, al realizar análisis estadístico con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett no se encontró diferencia significativa con respecto al control ($p= 0.11$) (Figura 13). En base a esta información podemos decir que el efecto de la histamina sobre la proliferación de FPHN está regulado al menos parcialmente por la inhibición de los SOC específicamente por 2-APB.

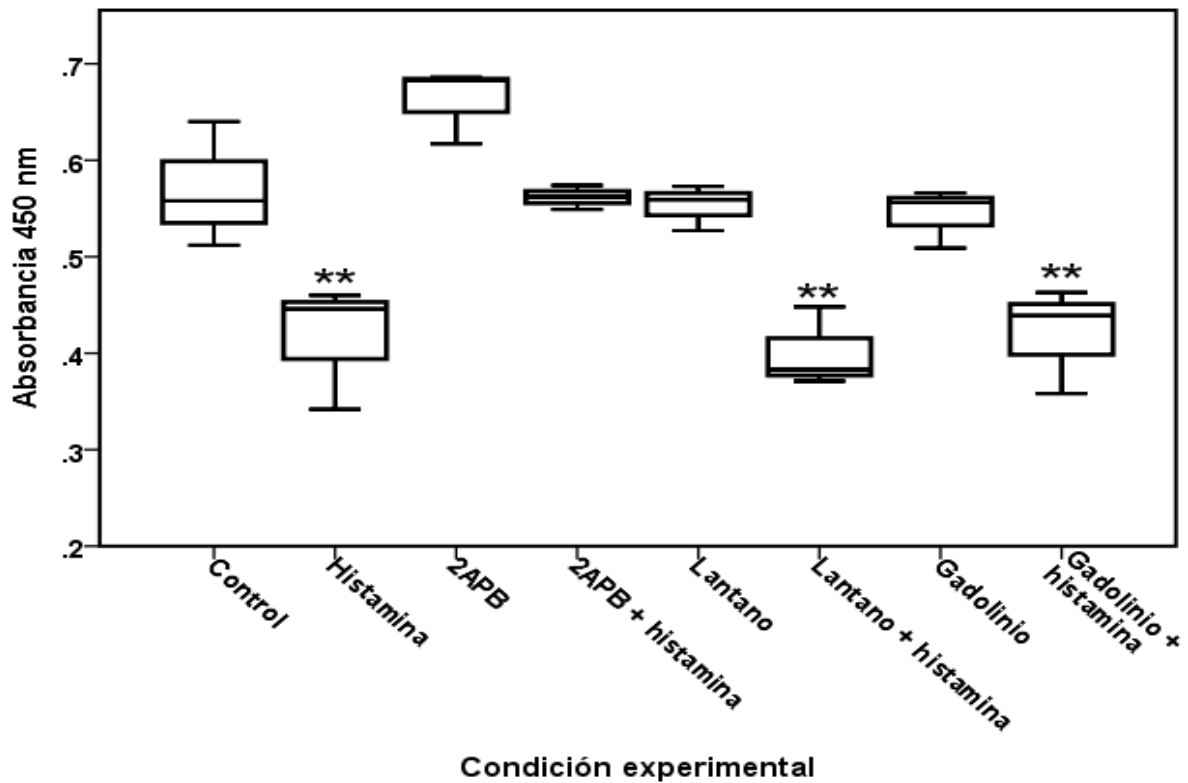


Figura 13. Efecto de la inhibición de los SOC sobre la proliferación de FPHN. Línea NOVA P: 12 Los fibroblastos fueron transferidos en confluencia temprana de cajas T-25 a cajas de 48 pozos, los estímulos se agregaron después de 24 horas de sincronización, la medición de la proliferación se realizó con CCK-8. Las gráficas de caja representan el rango intercuartílico de 6 mediciones de proliferación, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para diferencia entre grupos ** $p < 0.05$

DETERMINACIÓN DEL GEN DE COLAGENO

Para la determinación del gen de colágeno en los FPHN se siguieron pasos similares al de la técnica estandarizada de proliferación celular como la transferencia de los fibroblastos con medio Ham-F12 con SFB al 10%, mismas condiciones del control, dilución de los bloqueadores con las misma condición que el control así como de la histamina y sobre todo la sincronización de los cultivos, en éstos experimentos debido a la necesidad de aislar una cantidad adecuada de RNA se utilizaron pozos de mayor superficie y por ende mayor número de células por pozo.

El aislamiento de RNA total se realizó a las 48 horas de incubadas las células mediante técnica de TRizol, y posteriormente se realizó RT-PCR con la técnica que se describe en la metodología.

TECNICA ESTANDARIZADA PARA OBTENCION DEL GEN DE COLAGENO EN FPHN

- 1) Transferir de células en confluencia temprana de cajas T-25 a cajas de 6 pozos, realizando el cálculo del número de cajas necesarias para llenar una placa de 6 pozos dividiendo el área de la caja T-25 (25 cm²) entre la suma de la superficie de la caja de 6 pozos (9.5 cm²).
- 2) Plaquear con medio Ham-F12 con SFB al 10% e incubar los cultivos.
- 3) Sincronizar los cultivos celulares por 24 horas (con medio sin suero), al observar que las células estén en confluencia temprana.
- 4) Colocar las condiciones experimentales con células sincronizadas.
- 5) Utilizar como control medio Ham- F12 con SFB al 1%, el resto de las condiciones deberán ser diluidas con la misma condición que el control.
- 6) Aislar RNA total a las 48 horas de incubadas las células con las condiciones con técnica de TRizol ya descrita, congelar el RNA a -70°C.
- 7) Descongelar RNA para realizar RT-PCR conservando la muestra siempre en hielo.

La determinación del gen de colágeno fue realizada con sólo 3 condiciones experimentales: control (medio Ham F12/SFB1%), histamina 100 µM y medio con SFB al 10%. El

resultado observado fue que la histamina disminuyó la expresión del gen de colágeno en comparación al control, al aplicar prueba estadística t para muestras independientes se reporta una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0028$), en la figura 13 se muestra el resultado del grupo de histamina y el control.

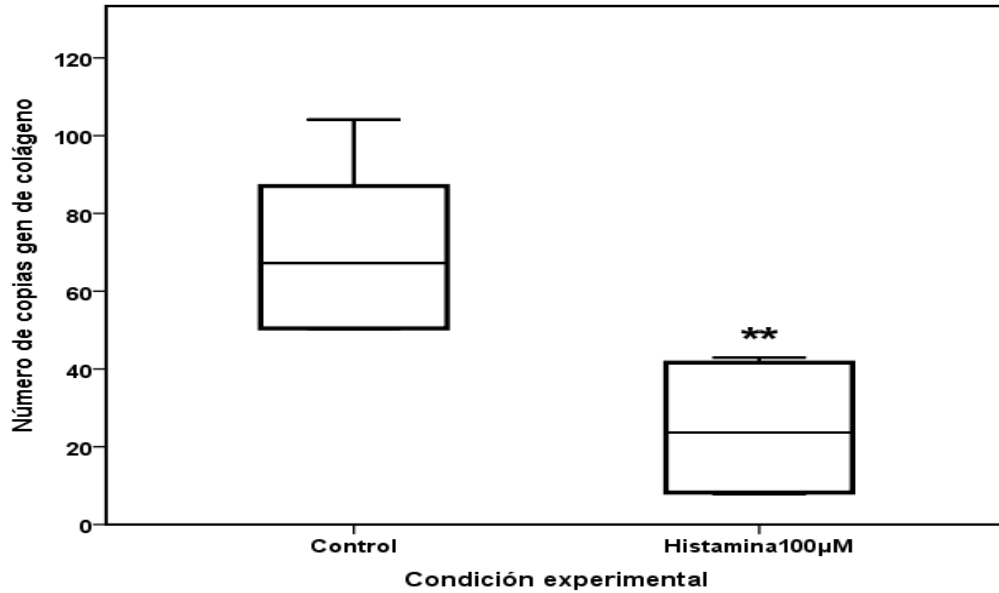


Figura 14. Efecto de la histamina sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN. Línea NOVA P: 11 Se transfieren fibroblastos de cajas T-25 a placas de 6 pozos, previo a la aplicación de las condiciones experimentales las células son sincronizadas por 24 horas. La extracción de RNA se realiza a las 48 horas de incubación por técnica de TRizol. Las cajas representan el rango intercuartílico de 12 mediciones de RT-PCR, los datos fueron analizados con prueba t para muestras independientes ** $p=0.0028$.

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLAGENO EN FPHN

Se realizó RT-PCR por triplicado por cada pozo para cuantificar la expresión del gen de colágeno a las 48 horas de aplicarse el estímulo de histamina. Se utilizó la metodología ya descrita anteriormente. El resultado tuvo consistencia en los experimentos subsecuentes corroborando que en las líneas celulares utilizadas en éstos experimentos la histamina disminuyó la expresión de colágeno; al realizar prueba estadística *t* para muestras independientes se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa $p= 0.038$ (figura 15)

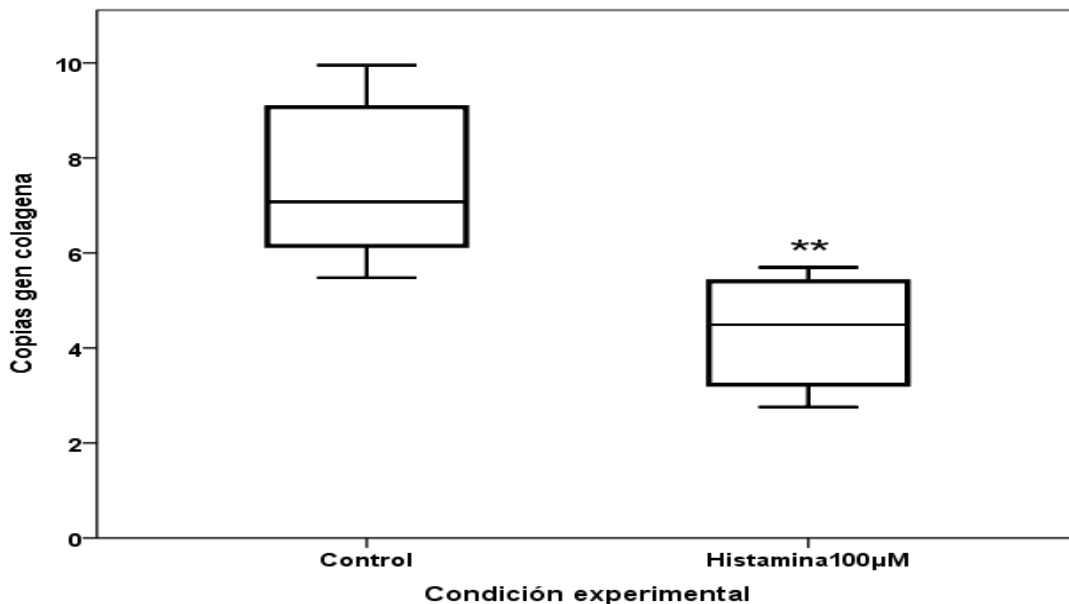


Figura 15. Efecto de la histamina sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN. Línea Nova: P: 11 y P: 12, resultado de dos experimentos por duplicado. Los fibroblastos son transferidos de cajas T-25 a placas de 6 pozos, previo a la aplicación de las condiciones experimentales las células son sincronizadas por 24 horas, la extracción del RNA se realiza mediante técnica de TRizol a las 48 horas de incubación de las células, se realiza RT-PCR por triplicado. Las cajas representan el rango intercuartílico de 12 mediciones de RT-PCR, los bigotes los valores mínimo y máximo, los datos fueron analizados con prueba *t* para muestras independientes ** $p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS RECEPTORES H1 Y H2 SOBRE LA EXPRESION DE COLAGENO EN FPHN

Para probar el efecto de la inhibición de los H1R y H2R sobre la expresión de colágeno sólo se utilizó un antagonista de cada receptor, pirilamina para bloquear a los H1R y cimetidina como bloqueador de los H2R a dosis de 1 μ M y 10 μ M respectivamente. Las células fueron tratadas con la metodología ya referida.

Se observó que al aplicar pirilamina no se modificó la expresión de colágeno como era de esperar con respecto al control, y en presencia de este antagonista el efecto de la histamina fue claramente inhibido, al analizar los datos con ANOVA y realizar prueba post hoc de Dunnett para comparar con el control se encontró diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$

El efecto de la cimetidina sobre la expresión de colágeno es poco valorable ya que al igual que la pirilamina no debió haber modificado la expresión del gen colágeno con respecto al control, queda la interrogante si la cimetidina ejerció un efecto tóxico sobre los fibroblastos, o quizá debemos emplear una dosis menor, sin embargo el efecto de la histamina no fue inhibido en presencia de este antagonista como sucedió con pirilamina, incluso pareciera disminuir la expresión del gen aún más, los datos que tenemos en cuanto al comportamiento de la cimetidina son poco interpretables por lo expuesto anteriormente. Con esta información podemos decir que la histamina inicia señalización intracelular e incrementó de la expresión del gen de colágeno a través de los H1R (figura 16)

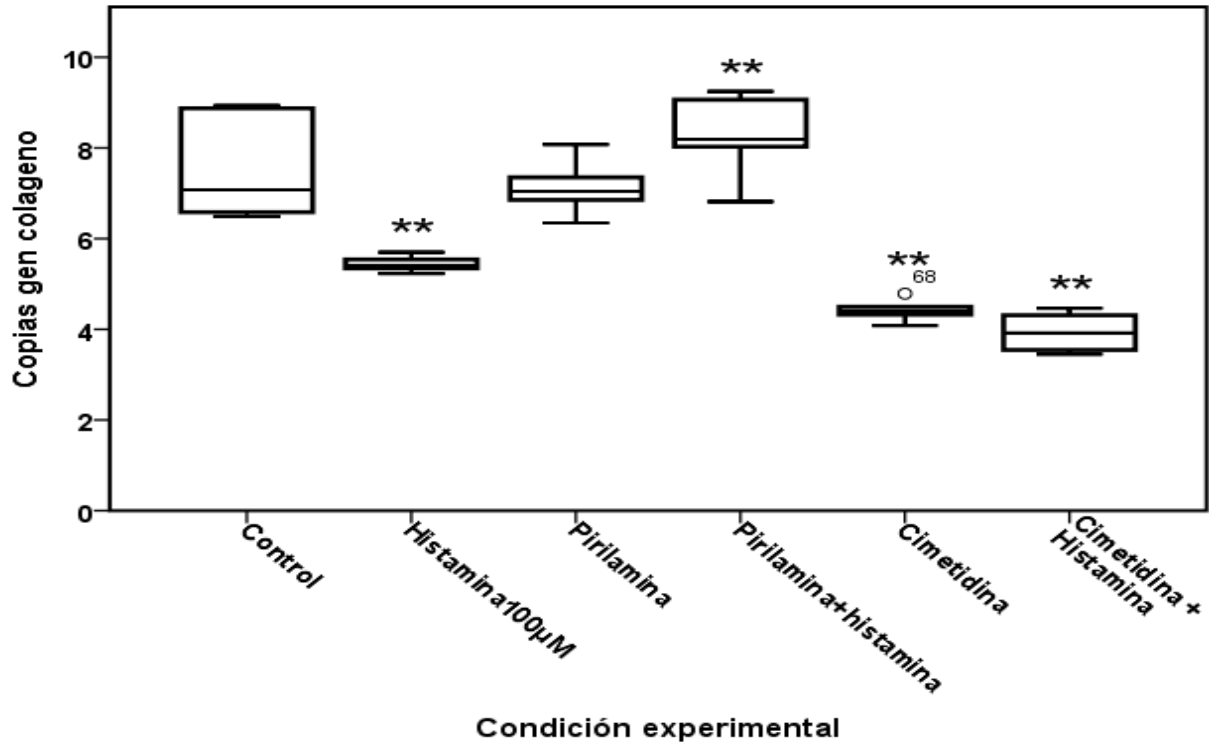


Figura 16. Efecto de los antagonistas de los receptores H1 pirilamina y del receptor H2 cimetidina sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN. Línea NOVA P: 8 y 11. Los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 a cajas de 6 pozos, al estar en confluencia temprana se sincronizaron los cultivos por 24 horas y posteriormente se aplicaron las condiciones experimentales, la histamina a dosis de $100\mu\text{M}$ se aplicó a los 20 minutos de incubadas las células con los antagonistas H1 y H2. Se realizó extracción de RNA por técnica de TRizol a las 48 horas de incubadas las células. Cada caja representa el rango intercuartil de 9 valores de RT-PCR. Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett $**p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PLC SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN

Para la determinación del gen de colágeno después de aplicar los bloqueadores de U73122 y su análogo inactivo U73343 se siguió el mismo procedimiento para transferir los fibroblastos a cajas de 6 pozos, se sincronizaron las células por 24 horas previo a la aplicación de los bloqueadores y la histamina a los 20 minutos de incubadas las células con los bloqueadores. El resultado fue similar a los experimentos de proliferación observando que estos bloqueadores afectaron la viabilidad celular, la inspección visual de los pozos demostró desprendimiento y disminución de la celularidad, la cuantificación del gen de colágeno es prácticamente nula después de aplicar el estímulo con histamina. El efecto de estos bloqueadores no es interpretable por la razón anteriormente expuesta (figura 17).

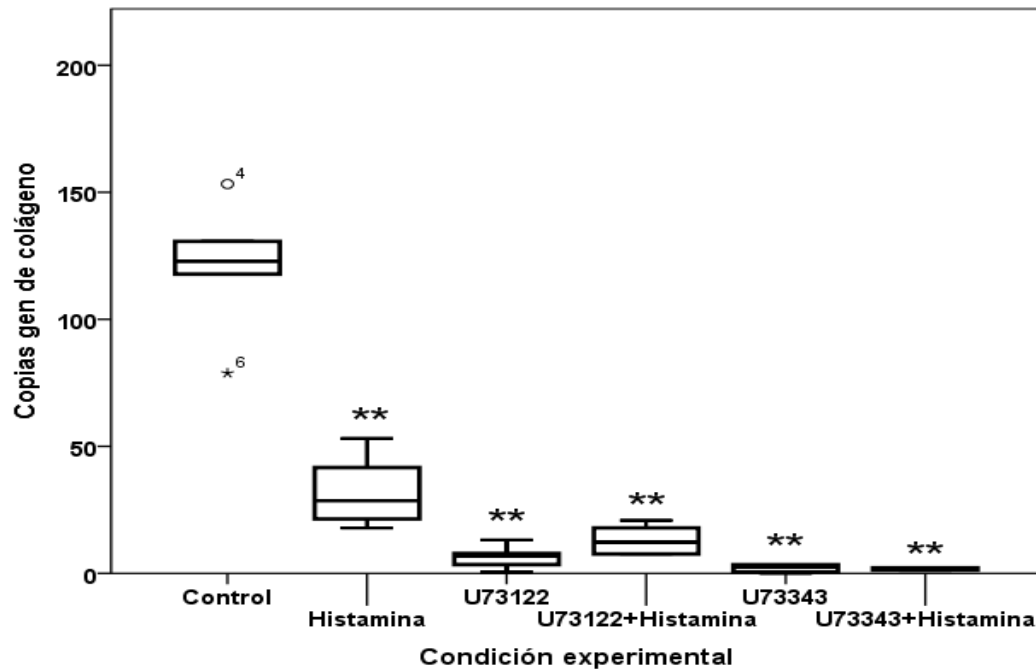


Figura 17. Efecto de la inhibición de la PLC sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN. Línea NOVA P: 13 y FN-4-12 P: 12. Resultados de dos experimentos por triplicado. Los fibroblastos fueron transferidos de cajas T-25 en confluencia temprana a cajas de 6 pozos, los cultivos fueron sincronizados por 24 horas y posteriormente se aplicaron los bloqueadores, el RNA se extrajo a las 48 horas de incubación. Cada caja representa el rango intercuartil de los valores de 18 mediciones de RT-PCR. Los datos se analizaron con prueba estadística ANOVA y prueba post hoc de Dunnett ** $p < 0.05$

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BOMBA DE CA²⁺ DEL RE SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN.

Para los experimentos de expresión del gen de colágeno se siguieron los pasos ya descritos para la transferencia de las células, la sincronización, extracción de RNA total y realización de RT-PCR. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: muy similar a los experimentos de proliferación el CPA disminuye significativamente la expresión del gen de colágeno y el efecto de la histamina no es revertido en presencia de este bloqueador, por lo cual podemos decir que en nuestras líneas celulares la histamina no evocó señal a través de la inhibición de la SERCA (figura 18).

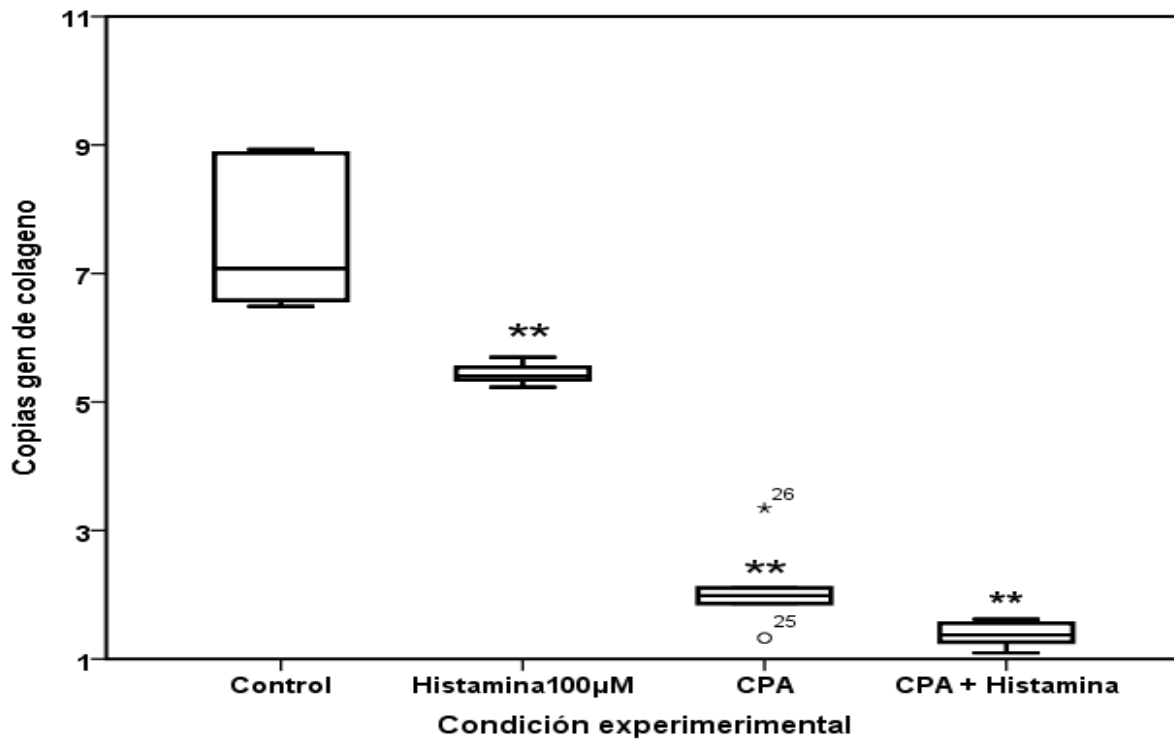


Figura 18. Efecto de la inhibición de la SERCA sobre la expresión de colágeno en FPHN. Línea NOVA P: 11. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 6 pozos, previo a la aplicación de las condiciones experimentales se sincronizaron las células por 24 horas. La extracción de RNA total se realizó a las 48 horas de incubación de las células y posteriormente se realizó la RT-PCR para la cuantificación del número de copias del gen de colágeno. La diferencia entre grupos fue analizada con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para comparar con el grupo control ** $p < 0.05$, las cajas representan el RI de 9 valores de RT-PCR, los bigotes el valor mínimo y máximo, * valores atípicos.

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS CANALES DE CA²⁺ OPERADOS POR ALMACÉN (SOC) SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO EN FPHN.

La expresión de colágeno después de aplicar los bloqueadores de los SOC se realizó bajo las mismas condiciones que los experimentos previos. El efecto del 2-APB no es interpretable ya que este bloqueador por sí mismo disminuyó significativamente la expresión del gen de colágeno y en presencia de este bloqueador el efecto de la histamina no se vio contrarrestado. La³⁺ también disminuyó por sí mismo la expresión de colágeno, al analizar los datos con ANOVA y prueba post hoc de Dunnett se encuentra una diferencia significativa ($p=0.031$), posteriormente al ser aplicada la histamina esta molécula no se inhibe en presencia de La³⁺. El Gd³⁺ no modificó la expresión del gen y se mantuvo sin diferencia significativa con respecto al control, sin embargo el efecto de la histamina tampoco se ve revertido por este bloqueador, con esta información podemos decir que la expresión del gen de colágeno en nuestras líneas de fibroblastos al parecer no está mediada vía SOC (figura 19).

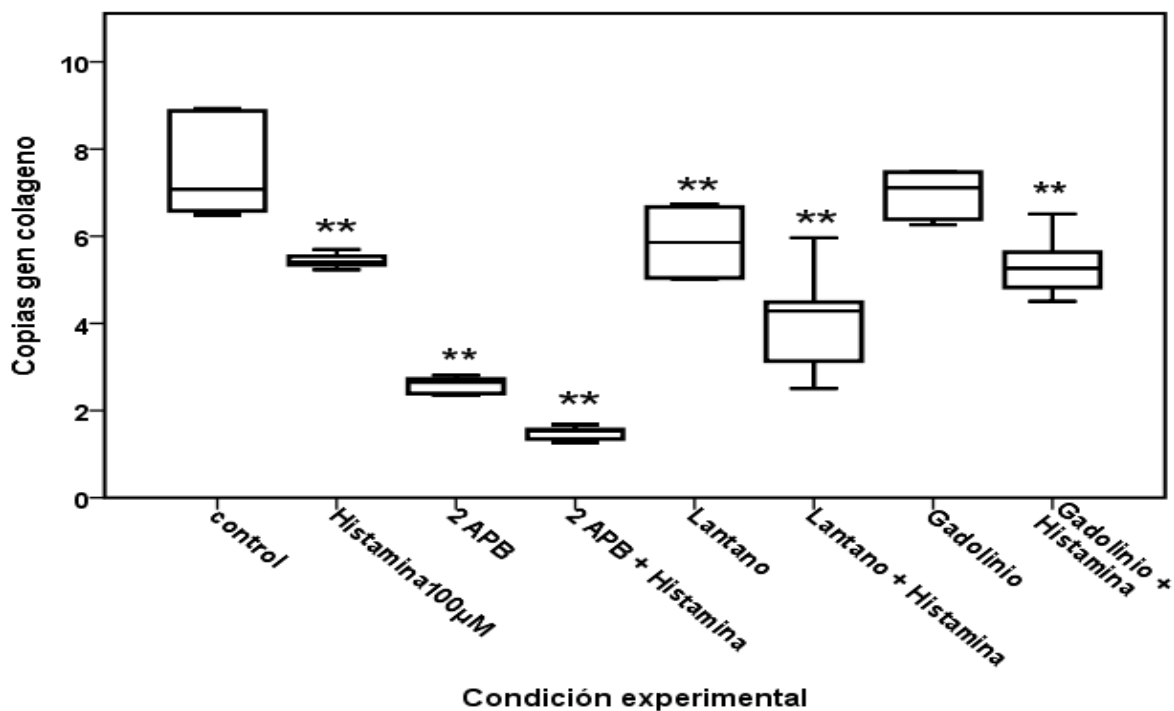


Figura 19. Efecto de la inhibición de los canales de Ca²⁺ operados por almacén (SOC) sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN. Las células fueron transferidas de cajas T-25 a cajas de 6 pozos, previo a la aplicación de las condiciones experimentales se sincronizaron las células por 24 horas. La extracción de RNA total se realizó a las 48 horas de incubación de las células. Se realiza RT-PCR para la cuantificación del número de copias del gen de colágeno. Línea NOVA P: 11, las cajas representan el RI de 9 valores de RT-PCR, los bigotes el valor mínimo y máximo, los datos fueron analizados con prueba estadística ANOVA y prueba post hoc de Dunnett para comparación con el grupo control ** $p < 0.05$

DISCUSIÓN

Estudiar el efecto de la histamina sobre la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano es importante, ya que existen enfermedades como el asma que es considerada la enfermedad pulmonar crónica más frecuente de la infancia y su prevalencia continua incrementándose en todo el mundo, por lo cual es ahora reconocida como un serio problema global de salud, se estima que existen aproximadamente 300 millones de asmáticos en el mundo y un 10% de estos pacientes desarrollará asma severa persistente; a pesar de un tratamiento optimo estos pacientes iniciaran un proceso de remodelación pulmonar, que es un daño producido sobre el epitelio de la vía aérea que estimula la generación de factores de crecimiento fibroproliferativos (Horie y cols., 2014)(Horie y cols., 2014)(Horie y cols., 2014)(Horie y cols., 2014)(Horie y cols., 2014)(Horie y cols., 2014). En un estudio realizado en el Laboratorio de Medicina Experimental y en el Laboratorio de Fisiología de la BUAP, se observó que al estimular cultivos de FPHN con diferentes dosis de histamina se inducía una señal de Ca²⁺, concluyendo que la dosis optima de histamina que incrementó las [Ca²⁺]_i en el 96% de las células estimuladas fue de 100 μM, otro hallazgo fue que la histamina utilizó la vía del IP₃ para la liberación de [Ca²⁺]_i, ya que la respuesta fue inhibida cuando la actividad de la PLC fue bloqueada con U73122 (Romano Bernabe y cols., 2012). Hasta ahora no hay estudio que reporte si la activación de la vía de señalización de Ca²⁺ inducida por histamina, promueva un fenotipo en los fibroblastos de pulmón que se relacione con el desarrollo de fibrosis. Por tal motivo en nuestro estudio decidimos bloquear cada una de las vías de la señalización de Ca²⁺ y en presencia de histamina medir la proliferación y expresión del gen de colágeno. Para llegar a estos resultados primero tuvimos que estandarizar la técnica de proliferación de los fibroblastos y posteriormente aplicar los antagonistas de los HR1 y HR2, así como cada uno de los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ y en presencia de éstos bloqueadores se agregó la dosis máxima de histamina. Lo mismo hicimos para estandarizar la técnica de extracción de RNAm de los fibroblastos para posteriormente realizar RT-PCR.

Nuestros resultados fueron sorprendentes, ya que fueron contrarios a lo reportado en la literatura, cuyo efecto de la histamina es básicamente reportado como agente profibrosante (Jordana y cols., 1988; Veerappan y cols., 2012; Veerappan y cols., 2013). En nuestras líneas celulares NOVA y FN-4-12 observamos que la histamina a dosis máxima no indujo proliferación ni aumento en la expresión del gen de colágeno, por el contrario estos efectos se vieron disminuidos con respecto al control de una manera estadísticamente significativa, estos resultados fueron consistentes en los experimentos subsecuentes.

Jordana y cols, (Jordana y cols., 1988), estimularon fibroblastos de cultivos primarios de pulmón con diferentes dosis de histamina, bloqueando los receptores H1 y H2, observando que la histamina ejercía su efecto a diferentes dosis, el efecto proliferativo de la histamina estuvo mediado por los receptores H1, sin embargo no explica el mecanismo molecular por el cual la histamina ejerció su efecto. Veerappan y cols., han probado el efecto de la histamina en modelos murinos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, y han probado que ratones genéticamente deficientes de células cebadas (MCD) presentaron mayor protección a desarrollar fibrosis pulmonar mientras que dicha protección desaparecía al retar a los ratones MCD con bleomicina después de restaurar sus células cebadas pulmonares (Veerappan y cols., 2013).

Una posible explicación de nuestros hallazgos, es que una condición indispensable para el desarrollo de fibrosis es la activación de los fibroblastos que al estar bajo el estímulo constante de mediadores de la inflamación, cambian su fenotipo a miofibroblastos, condición que no tuvimos en nuestras líneas celulares las cuales fueron fibroblastos no activos. Otro estudio que refuerza más esta hipótesis son los trabajos realizados por Leonardi y cols., quienes estimularon fibroblastos conjuntivales normales y de queratoconjuntivitis vernal (QCV, un tipo de conjuntivitis atópica) con histamina en presencia de antagonistas H1 y H2, el efecto fue evaluado a través de la medición de la proliferación, migración y medición de procolágeno tipo I y III (PIP). Observaron que los fibroblastos derivados de QCV proliferaron con un índice mayor que los fibroblastos conjuntivales normales en ausencia de histamina, después de la estimulación con histamina ambos cultivos crecieron a un ritmo similar. Tanto los antagonistas H1 como los H2 inhibieron la proliferación inducida por la histamina de una manera significativa. Sin embargo los fibroblastos de QCV fueron más sensibles a la histamina produciendo más PIP que los fibroblastos normales. Concluyendo que la capacidad proliferativa de los fibroblastos de QCV puede ser el resultado de un crecimiento selectivo de una o más subpoblaciones de fibroblastos en un tejido crónicamente inflamado (Leonardi y cols., 1999).

Los resultados que observamos sobre la proliferación y expresión de colágeno están reforzados por el efecto que observamos al bloquear los receptores H1 y H2 con pirilamina y cimetidina respectivamente. Con respecto a la proliferación celular, al bloqueo tanto de los receptores H1 como H2 revirtió al menos parcialmente el efecto de la histamina, lo que nos hace pensar que es un efecto específico mediado por estos receptores.

En relación a la expresión de colágeno, fue interesante observar que el efecto de la histamina al parecer está mediado por los receptores H1, ya que la acción de la histamina fue

inhibida con la pirilamina pero no con la cimetidina. En un estudio reciente Horie y cols., observaron que la histamina indujo contracción de geles de colágeno de fibroblastos de pulmón humano, y este efecto estuvo mediado principalmente por los receptores H1 (Horie y cols., 2014). Sin embargo, es importante mencionar que se ha observado que el bloqueo de estos receptores es específico, dependiendo del órgano del cual procedan dichos fibroblastos; así lo demostró Murota y cols., cuando estimuló con histamina fibroblastos de piel y mucosa nasal y bloqueó los receptores H1 y H2, observando que al parecer la especificidad orgánica estaba implicada, ya que solo los fibroblastos de piel disminuyeron significativamente la expresión de colágeno tipo 1 al ser expuestos a difumarato de emedastina, un antagonista de los receptores H1 (Murota y cols., 2008).

Con lo referente al uso de los bloqueadores de Ca²⁺ y los resultados de proliferación y expresión de colágeno de los fibroblastos, observamos en las líneas de FPHN bloqueadores de la PLC (U73122 y U73343) afectaron directamente la viabilidad de las células, por lo cual los datos no fueron interpretables. El bloqueador de la bomba del retículo endoplásmico (SERCA) específicamente el CPA disminuyó por sí mismo la proliferación y expresión del gen en los FPHN y el efecto de la histamina no se vio inhibido en presencia de este bloqueador. El efecto de los bloqueadores de los SOC (2-APB, La³⁺ y Gd³⁺) en la proliferación de FPHN; se observó que 2-APB revierte en forma parcial el efecto de la histamina, mientras que en presencia de La³⁺ y Gd³⁺ la histamina no revirtió su efecto. Con lo que respecta al efecto de los bloqueadores de los SOC sobre la expresión del gen de colágeno, se observó que ninguno de estos bloqueadores revirtió el efecto de la histamina. En base a los resultados de nuestros experimentos, es difícil concluir que el efecto de la histamina sobre la proliferación y expresión del gen de colágeno en nuestros FPHN está mediado por la vía de la señalización de Ca²⁺, ya que sólo 2-APB bloquea parcialmente el efecto de la histamina en el fenómeno de proliferación.

Otra posible explicación a nuestros resultados es que trabajamos con fibroblastos de pulmón humano normal no activados, que no han cambiado su fenotipo a miofibroblastos, tal como lo explica Hinz y cols., en su trabajo donde analizaron el origen y las características específicas de miofibroblastos de diferentes lesiones fibróticas; resumiendo que existen factores que afectan la génesis de los miofibroblastos y su diferenciación desde células precursoras (fibroblastos) y estos factores pueden ser más complejos aún, particularmente hablando de factores epigenéticos tales como metilación del DNA, microRNAs y modificación de histonas factores que controlan la expresión de α -actina de musculo liso en los miofibroblastos; marcador más usado para determinar el fenotipo de miofibroblastos el cual le confiere actividad contráctil a

estas células, las cuales pueden evocar una señal de Ca²⁺ ya que funcionan como células fisiológicamente excitables (Hinz y cols., 2012). Pocos años antes Liang y cols., fueron los primeros en reportar una señal de Ca²⁺ evocada por histamina específicamente en miofibroblastos valvulares humanos (Liang y cols., 2003), resultados que podemos interpretar mejor con los estudios realizados por Hinz es este tipo particular de células.

Los resultados de nuestro trabajo son muy interesantes y controversiales, podemos decir que las fortalezas de nuestro estudio están basadas en la consistencia de los resultados en cada experimento realizado. Sin embargo también tiene limitaciones tales como haber utilizado solo una técnica para medir proliferación celular, haber estudiado el efecto de la histamina y bloqueadores de canales de Ca²⁺ sólo en líneas de fibroblastos de pulmón humano normal, haber medido solo la expresión génica de colágeno y no de otros genes que pudieran estar involucrados, limitación en cuanto al tiempo de medición de dichos fenómenos.

Dentro de los estudios que proponemos para esclarecer y darle valor a nuestros resultados, es el realizar experimentos donde podamos probar el efecto de la histamina tanto en cultivos de fibroblastos normales como en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en modelos murinos, realizar estudios de micro arreglos para estudiar que otros genes están afectados, estudios con marcadores específicos para determinar si nuestros fibroblastos expresan α -actina de músculo liso. Estudios que determinen la influencia de factores epigenéticos tales como metilación de DNA y modificación de histonas en los fibroblastos.

Queda mucho por investigar de éstas emblemáticas células, sin embargo con este estudio abrimos la posibilidad de que en el proceso de la fibrosis intervienen factores más complejos que la sola exposición de los fibroblastos a la histamina; factores como la especificidad orgánica y epigenéticos que contribuyen a que cada tipo de fibroblasto responda de una manera particular a los estímulos que se aplican in vitro.

CONCLUSIONES

- La histamina a una concentración de 100 μ M disminuyó la proliferación en cultivos de FPHN.
- La histamina a una concentración de 100 μ M disminuyó la expresión del gen de colágeno en cultivos de FPHN.
- El efecto de la histamina sobre la proliferación en FPHN está mediado al menos parcialmente por los receptores H1 y H2.
- El efecto de la histamina sobre la expresión del gen de colágeno en FPHN está mediado principalmente por los receptores H1.
- El efecto de los bloqueadores de la PLC sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN no es interpretable ya que la viabilidad de las células se vio afectada.
- El efecto del bloqueador de la SERCA (CPA) sobre la proliferación y expresión de colágeno en FPHN no es interpretable ya que este bloqueador disminuyó por sí mismo ambos fenómenos.
- El efecto de los bloqueadores de los SOC sobre la proliferación en FPHN está mediado parcialmente por 2-APB.
- El efecto de los bloqueadores de los SOC sobre la expresión de colágeno no está mediado por esta vía.

ANEXOS



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE MEDICINA EXPERIMENTAL**

CONSENTIMIENTO PARA DISPOSICIÓN DE TEJIDOS DE CADÁVERES CON FINES DE INVESTIGACIÓN

1.- DATOS DEL DONADOR O DISPONENTE:

RN (Iniciales apellidos): _____
Edad: ____ Sexo: __ Diagnóstico de ingreso: _____
Causa de muerte: _____ Fecha: _____ Hora _____
Nombre del Hospital: _____
Domicilio del Hospital: _____

2.- CONSENTIMIENTO DE DONACIÓN DE TEJIDOS

Yo _____ con parentesco por _____, del hoy occiso (a) C. _____, otorgo el consentimiento para donar **tejido pulmonar**. Ya que he recibido previamente información suficiente, oportuna, clara y veraz sobre los riesgos y beneficios esperados y una vez aclarada mis dudas otorgo este consentimiento en forma libre y voluntaria, entendiendo que será empleado exclusivamente para fines de investigación científica en el Laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la BUAP.

3.- DATOS DEL FAMILIAR QUE OTORGA EL CONSENTIMIENTO

Nombre: _____
Domicilio _____

Firma: _____

4.- DATOS DE DOS TESTIGOS

Nombre: _____
Parentesco: _____
Domicilio: _____

Firma _____

Nombre: _____
Parentesco: _____
Domicilio: _____

Firma: _____

El presente consentimiento se encuentra debidamente elaborado con fundamento en los artículos 324, 325, 326 y 327 de la Ley General de Salud, y el artículo 14 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario para la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos. Anexar copia de identificación oficial de los testigos (credencial de elector, pasaporte, cartilla o licencia vigentes)

BIBLIOGRAFIA:

- Akdis M., Verhagen J., Taylor A., Karamloo F., Karagiannidis C., Cramer R., Thunberg S., Deniz G., Valenta R., Fiebig H., Kegel C., Disch R., Schmidt-Weber C.B., Blaser K., Akdis C.A. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 199:1567-1575.
- Al-Muhsen S., Johnson J.R., Hamid Q. (2011). Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128:451-462.
- Arima M., Fukuda T. (2011). Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J. Intern. Med.* 26:8-18.
- Baker C.D., Alvira C.M. (2014). Disrupted lung development and bronchopulmonary dysplasia: opportunities for lung repair and regeneration. *Curr. Opin. Pediatr.* 26:306-314.
- Bara I., Ozier A., Tunon de Lara J.M., Marthan R., Berger P. (2010). Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur. Respir. J.* 36:1174-1184.
- Bedolla-Barajas M., Barrera-Zepeda A.T., Lopez-Zaldo J.B., Morales-Romero J. (2013). Asthma in Mexican school-age children is not associated with passive smoking or obesity. *Asia Pac. Allergy* 3:42-49.
- Berra-Romani R., Raqeeb A., Avelino-Cruz J.E., Moccia F., Oldani A., Speroni F., Taglietti V., Tanzi F. (2008). Ca²⁺ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. *Cell Calcium* 44:298-309.
- Berridge M.J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40:297-309.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:517-529.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:11-21.
- Bird S.D., Walker R.J. (1998). Mast cell histamine-induced calcium transients in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit. Dial. Int.* 18:626-636.
- Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J., Peppiatt C.M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J.* 16:1145-1150.
- Bublitz M., Musgaard M., Poulsen H., Thogersen L., Olesen C., Schiott B., Morth J.P., Moller J.V., Nissen P. (2013). Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 288:10759-10765.
- Cairns J.A., Walls A.F. (1997). Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest* 99:1313-1321.

Constantino G.T., Mello Jr J.F. (2009). Remodeling of the lower and upper airways. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 75:151-156.

Del-Rio-Navarro B., Del Rio-Chivardi J.M., Berber A., Sienra-Monge J.J., Rosas-Vargas M.A., Baeza-Bacab M. (2006). Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proc.* 27:334-340.

Dunford P.J., O'Donnell N., Riley J.P., Williams K.N., Karlsson L., Thurmond R.L. (2006). The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J. Immunol.* 176:7062-7070.

Dy M., Schneider E. (2004). Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:393-410.

Esbenshade T.A., Kang C.H., Krueger K.M., Miller T.R., Witte D.G., Roch J.M., Masters J.N., Hancock A.A. (2003). Differential activation of dual signaling responses by human H1 and H2 histamine receptors. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 23:17-31.

Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schioth H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:1256-1272.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). 2011.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). 2015.

Gistelink C., Gioia R., Gagliardi A., Tonelli F., Marchese L., Bianchi L., Landi C., Bini L., Huysseune A., Witten P.E., Staes A., Gevaert K., De R.N., Menten B., Malfait F., Leikin S., Carra S., Tenni R., Rossi A., De P.A., Coucke P., Willaert A., Forlino A. (2016). Zebrafish Collagen Type I: Molecular and Biochemical Characterization of the Major Structural Protein in Bone and Skin. *Sci. Rep.* 6:21540.

Guerrero-Hernandez A., Dagnino-Acosta A., Verkhatsky A. (2010). An intelligent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium* 48:143-149.

Guzman-Silva A., Vazquez de Lara L.G., Torres-Jacome J., Vargaz-Guadarrama A., Flores-Flores M., Pezzat S.E., Lagunas-Martinez A., Mendoza-Milla C., Tanzi F., Moccia F., Berra-Romani R. (2015). Lung Beractant Increases Free Cytosolic Levels of Ca²⁺ in Human Lung Fibroblasts. *PLoS. One.* 10:e0134564.

Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 88:1183-1241.

Harijith A., Choo-Wing R., Cataltepe S., Yasumatsu R., Aghai Z.H., Janer J., Andersson S., Homer R.J., Bhandari V. (2011). A role for matrix metalloproteinase 9 in IFN γ -mediated injury in developing lungs: relevance to bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44:621-630.

Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Prunotto M., Desmouliere A., Varga J., De W.O., Mareel M., Gabbiani G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.* 180:1340-1355.

Horie M., Saito A., Yamauchi Y., Mikami Y., Sakamoto M., Jo T., Nakajima J., Takizawa H., Nagase T., Kohyama T. (2014). Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp. Lung Res.* 40:222-236.

Hough L.B. (2001). Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol. Pharmacol.* 59:415-419.

Iino M. (2010). Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86:244-256.

Jordana M., Befus A.D., Newhouse M.T., Bienenstock J., Gauldie J. (1988). Effect of histamine on proliferation of normal human adult lung fibroblasts. *Thorax* 43:552-558.

Jutel M., Akdis M., Akdis C.A. (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin. Exp. Allergy* 39:1786-1800.

Kadler K. (1995). Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein Profile.* 2:491-619.

Karimi P., Peters K.O., Bidad K., Strickland P.T. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *Eur. J. Epidemiol.* 30:91-101.

Kawanami O., Ferrans V.J., Fulmer J.D., Crystal R.G. (1979). Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 40:717-734.

Kimura J., Ono T., Sakamoto K., Ito E., Watanabe S., Maeda S., Shikama Y., Yatabe M.S., Matsuoka I. (2009). Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression and its modulation. *Biol. Pharm. Bull.* 32:325-331.

Kohyama T., Yamauchi Y., Takizawa H., Kamitani S., Kawasaki S., Nagase T. (2010). Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol. Cell Biochem.* 337:77-81.

Krebs J., Agellon L.B., Michalak M. (2015). Ca homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460:114-121.

Lai C.K., Beasley R., Crane J., Foliaki S., Shah J., Weiland S. (2009). Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 64:476-483.

Leonardi A., Radice M., Fregona I.A., Plebani M., Abatangelo G., Secchi A.G. (1999). Histamine effects on conjunctival fibroblasts from patients with vernal conjunctivitis. *Exp. Eye Res.* 68:739-746.

Liang W., McDonald P., McManus B., van B.C., Wang X. (2003). Histamine-induced Ca²⁺ signaling in human valvular myofibroblasts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35:379-388.

- Marenholz I., Heizmann C.W., Fritz G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:1111-1122.
- Martel-Pelletier J., Boileau C., Pelletier J.P., Roughley P.J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 22:351-384.
- Meiler F., Zumkehr J., Klunker S., Ruckert B., Akdis C.A., Akdis M. (2008). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* 205:2887-2898.
- Molina-Hernandez A., Nunez A., Sierra J.J., Arias-Montano J.A. (2001). Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41:928-934.
- Murota H., Bae S., Hamasaki Y., Maruyama R., Katayama I. (2008). Emedastine difumarate inhibits histamine-induced collagen synthesis in dermal fibroblasts. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 18:245-252.
- Nakamura T., Itadani H., Hidaka Y., Ohta M., Tanaka K. (2000). Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:615-620.
- Niisato N., Ogata Y., Furuyama S., Sugiya H. (1996). Histamine H1 receptor-induced Ca²⁺ mobilization and prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. Possible role of receptor-operated Ca²⁺ influx. *Biochem. Pharmacol.* 52:1015-1023.
- Notcovich C., Diez F., Tubio M.R., Baldi A., Kazanietz M.G., Davio C., Shayo C. (2010). Histamine acting on H1 receptor promotes inhibition of proliferation via PLC, RAC, and JNK-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 316:401-411.
- O'Mahony L., Akdis M., Akdis C.A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128:1153-1162.
- Ogasawara M., Yamauchi K., Satoh Y., Yamaji R., Inui K., Jonker J.W., Schinkel A.H., Maeyama K. (2006). Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J. Pharmacol. Sci.* 101:24-30.
- Parekh A.B., Putney J.W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757-810.
- Parsons M.E., Ganellin C.R. (2006a). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1:S127-S135.
- Parsons M.E., Ganellin C.R. (2006b). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1:S127-S135.
- Phan S.H. (2008). Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5:334-337.
- Ricard-Blum S., Ballut L. (2011). Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci. (Landmark. Ed)* 16:674-697.

Romano Bernabe, F., Vazquez de Lara, L., Lopez Colombo, A., Berra Romani, R. Caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la señal de calcio intracelular evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano. 1-59. 30-7-2012. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Saligrama N., Noubade R., Case L.K., del R.R., Teuscher C. (2012). Combinatorial roles for histamine H1-H2 and H3-H4 receptors in autoimmune inflammatory disease of the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* 42:1536-1546.

Silver R.B., Poonwasi K.S., Seyedi N., Wilson S.J., Lovenberg T.W., Levi R. (2002). Decreased intracellular calcium mediates the histamine H3-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:501-506.

Smyth J.T., Hwang S.Y., Tomita T., DeHaven W.I., Mercer J.C., Putney J.W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J. Cell Mol. Med.* 14:2337-2349.

Strachan D.P., Ait-Khaled N., Foliaki S., Mallol J., Odhiambo J., Pearce N., Williams H.C. (2015). Siblings, asthma, rhinoconjunctivitis and eczema: a worldwide perspective from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Clin. Exp. Allergy* 45:126-136.

Stramer B.M., Mori R., Martin P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J. Invest Dermatol.* 127:1009-1017.

Strehler E.E., Filoteo A.G., Penniston J.T., Caride A.J. (2007). Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 35:919-922.

Subbarao P., Mandhane P.J., Sears M.R. (2009). Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ.* 181:E181-E190.

Tagaya E., Tamaoki J. (2007). Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol. Int.* 56:331-340.

Tanaka S., Deai K., Konomi A., Takahashi K., Yamane H., Sugimoto Y., Ichikawa A. (2004). Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 34:1472-1482.

Tardivel-Lacombe J., Morisset S., Gbahou F., Schwartz J.C., Arrang J.M. (2001). Chromosomal mapping and organization of the human histamine H3 receptor gene. *Neuroreport* 12:321-324.

Thurmond R.L., Gelfand E.W., Dunford P.J. (2008). The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:41-53.

Van P.F. (2012). Ryanodine receptors: structure and function. *J. Biol. Chem.* 287:31624-31632.

Vargas Becerra M.H. (2009). [Epidemiology of asthma]. *Rev. Alerg. Mex.* 56 Suppl 1:S3-S9.

Veerappan A., O'Connor N.J., Brazin J., Reid A.C., Jung A., McGee D., Summers B., Branch-Elliman D., Stiles B., Worgall S., Kaner R.J., Silver R.B. (2013). Mast cells: a pivotal role in pulmonary fibrosis. *DNA Cell Biol.* 32:206-218.

Veerappan A., Reid A.C., O'Connor N., Mora R., Brazin J.A., Estephan R., Kameue T., Chen J., Felsen D., Seshan S.V., Poppas D.P., Maack T., Silver R.B. (2012). Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 302:F192-F204.

Wada H., Inagaki N., Itowi N., Yamatodani A. (1991). Histaminergic neuron system: morphological features and possible functions. *Agents Actions Suppl* 33:11-27.