



ARCHIVOS DE BRONCONEUMOLOGIA

www.archbronconeumol.org



Inflamación y remodelación de la vía aérea pequeña: estudios en humanos y modelos experimentales

David Ramos-Barbón^a y Antonio Parra-Arrondo^b

^aServicio de Neumología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^bServicio de Alergología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, España

RESUMEN

Palabras clave:

Asma
Inflamación
Remodelación
Vía aérea pequeña

El asma se caracteriza por inflamación y remodelación de la vía aérea, que da lugar a la obstrucción de ésta y síntomas de sibilancias, opresión torácica, tos y disnea. La mayoría de estas observaciones surgen del estudio de muestras obtenidas de las vías aéreas centrales por distintos métodos, pero hoy en día se acepta que este proceso inflamatorio ocurre no sólo en la vía aérea central, sino también en la vía aérea pequeña (VAP) e incluso en el parénquima pulmonar de todos los pacientes asmáticos, incluso en aquellos con asma leve. Los linfocitos CD4+, eosinófilos activados, y la expresión de ARNm para interleucina 5 están presentes en mayor cantidad en la VAP. También existe remodelación, con incremento del grosor de la submucosa, capa muscular y adventicia. Este proceso inflamatorio causa un desacoplamiento entre el parénquima pulmonar y la vía aérea, dando lugar a una obstrucción de la pequeña vía aérea que hoy en día se considera como predominante en pacientes asmáticos. Los estudios de asma experimental en animales apoyan asimismo una relevante participación de la vía aérea distal. El reconocimiento del asma como una enfermedad que afecta a toda la vía aérea puede tener importancia clínica y obliga a considerar al pulmón distal como diana de cualquier estrategia terapéutica para un tratamiento efectivo de la enfermedad, aunque faltan estudios longitudinales que ayuden a valorar el impacto de la inflamación de la VAP y de su tratamiento en el asma.

© 2010 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Inflammation and remodeling of the distal airways: studies in humans and experimental models

ABSTRACT

Keywords:

Asthma
Inflammation
Remodeling
Small airways

Asthma is characterized by inflammation and remodeling of the airways, giving rise to airway obstruction and symptoms of wheezing, chest tightness, cough and dyspnea. Most of these observations arise from the study of samples obtained from the central airways by distinct methods. However, it is currently accepted that this inflammatory process occurs not only in the central airway but also in the small airway and even in the pulmonary parenchyma of all asthmatic patients, even those with mild asthma. CD4+ lymphocytes, activated eosinophils and IL-5 mRNA expression are present in a greater quantity in the small airways. Also present is remodeling, with an increase in submucosal thickness, the muscular layer and adventitia. This inflammatory process causes a disconnection between the pulmonary parenchyma and the airway, giving rise to obstruction of the small airway, which is currently considered to be predominant in asthmatic patients. Likewise, studies of experimental asthma in animals support the substantial role of the distal airway. Recognition that asthma affects the entire airway could be clinically important and lead to the distal lung being considered as a target in any effective therapeutic strategy. However, longitudinal studies are required to evaluate the impact of distal airway inflammation and its treatment in asthma.

© 2010 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El asma es una enfermedad respiratoria crónica que se caracteriza por obstrucción de la vía aérea e hiperrespuesta bronquial inespecífica. En este proceso inflamatorio participan varios tipos celulares y sus mediadores como células cebadas, eosinófilos activados, linfocitos T cooperadores con perfil de citocinas tipo T *helper-2* (Th2), células *natural killer*, neutrófilos, etc., y se producen cambios estructurales como despegamiento epitelial, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial, hipertrofia de glándulas mucosas y fibrosis subepitelial.

La mayoría de estas observaciones surgen de estudios de las vías aéreas centrales obtenidas mediante broncoscopia, lavado bronquioalveolar o esputo inducido; sin embargo, el conocimiento de los fenómenos inflamatorios que ocurren en la vía aérea pequeña (VAP) es más reciente. Aunque ya se sugería su papel en la década de los setenta¹², el concepto de "zona silente" que se atribuyó a la VAP tras la publicación de los estudios morfométricos de Green³ y Mead⁴, según los cuales en la VAP reside menos del 10% de la resistencia pulmonar total, y la dificultad en obtener muestras adecuadas para su estudio, retrasaron el conocimiento de la inflamación de la VAP en el asma y su relevancia.

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas de fisiología respiratoria enfocadas al pulmón distal, nuevas técnicas de imagen y la aplicación de la inmunohistoquímica a autopsias y biopsias de parénquima pulmonar han permitido avanzar en el conocimiento del proceso inflamatorio en la VAP y de su importancia en la patogenia del asma. Sabemos que en el asma, independientemente de su gravedad, existe inflamación, obstrucción y remodelación que afecta a todo el tracto respiratorio⁵, incluso al parénquima pulmonar⁶, que las partículas alergénicas pueden alcanzar la VAP^{7,8} y que las citocinas proinflamatorias tipo Th2 están presentes también en la VAP^{9,10}. Se sabe además que los receptores de los esteroides están presentes en todas las células del tracto respiratorio y la densidad de estos receptores se incrementa en las vías aéreas más periféricas¹¹. También que el volumen total y la superficie combinada de la VAP es mucho mayor que el volumen combinado y superficie de las grandes vías aéreas¹², por lo que la inflamación en la VAP contribuye de forma muy significativa a la obstrucción al flujo aéreo en pacientes con asma¹³⁻¹⁵.

Distintos estudios relacionan la inflamación de la VAP con una mayor hiperrespuesta bronquial inespecífica, así como con varios fenotipos de asma que incluyen el asma nocturna (AN), exacerbaciones espontáneas de asma, asma complicada con tabaquismo o infecciones virales del tracto respiratorio, así como el asma grave corticoides dependiente¹². En este artículo revisaremos la evidencia actual publicada sobre la inflamación de la VAP y del parénquima pulmonar en el asma, así como su posible contribución a la patogenia de la enfermedad.

Inflamación y remodelación de la vía aérea pequeña en el asma: datos en humanos

Los estudios preliminares sobre el papel de la VAP en el asma proceden de autopsias de pacientes muertos por asma o estudios de torcotomías. En ellos se demuestra que toda la longitud de la vía aérea está implicada en el asma. Se objetivan tapones mucosos, estrechamiento y la presencia de inflamación por eosinófilos y células CD3+, tanto en la vía aérea central como en la VAP y el parénquima pulmonar de pacientes asmáticos^{5,12}. Carroll et al¹⁶ examinaron, mediante autopsias post mórtem, la distribución de células inflamatorias a través del árbol bronquial de pacientes que experimentaron tanto asma fatal como no fatal. Demostraron un incremento en el número de linfocitos y eosinófilos que se distribuyen de forma uniforme por toda la vía aérea, tanto si tienen asma leve como fatal, comparados con lo que se ve en controles, lo que fue confirmado por otros autores que estudiaron casos de muerte súbita por asma¹⁷.

Hamid¹⁸ y su grupo estudiaron biopsias de pacientes sometidos a cirugía torácica, tanto asmáticos como no asmáticos, y demostraron que el número de linfocitos T CD3+ y eosinófilos activados (EG2+)

están elevados, tanto en la vía aérea central como en la VAP, en pacientes asmáticos respecto a controles no asmáticos. En este caso, las células EG2+ eran más numerosas en la parte luminal de las vías menores de 2 mm de diámetro, comparado con la gran vía aérea, lo que sugiere un proceso inflamatorio más importante en la periferia^{5,18}. En el mismo grupo de pacientes vieron que el número de células que expresaban ARNm para interleucina 4 (IL-4) e IL-5 en la VAP estaba elevado en asmáticos cuando se comparaba con controles, y la expresión de ARNm para IL-5 se incrementaba en la VAP con respecto a las vías aéreas centrales⁹. También estaba incrementada la expresión de ARNm para eotaxina y proteína quimiotáctica de monocitos-4 (MCP-4) en la capa epitelial y en la pared de la VAP, por fuera del músculo liso, de pacientes asmáticos cuando se comparaba con controles no asmáticos¹⁰. En este caso, el número de células positivas para la quimiocina en la VAP se correlacionaba con el número de eosinófilos MBP+ en la misma. Estas observaciones fueron confirmadas por Haley¹⁹, quien demostró cómo la inflamación por leucocitos CD45+ y eosinófilos se extiende más allá del músculo liso de la VAP en pacientes que murieron de asma, de forma inversa a lo que ocurre en las vías aéreas mayores de 3 mm, donde son más numerosos en la parte interna de la pared bronquial. En pacientes muertos por asma, el infiltrado inflamatorio puede afectar incluso a las arteriolas pulmonares²⁰. Esta diferente distribución de células inflamatorias a lo largo del árbol traqueobronquial puede deberse a diferencias locales en los mecanismos de inflamación y reclutamiento celular y/o diferencias en el patrón de quimiocinas/citocinas entre estas regiones (fig. 1).

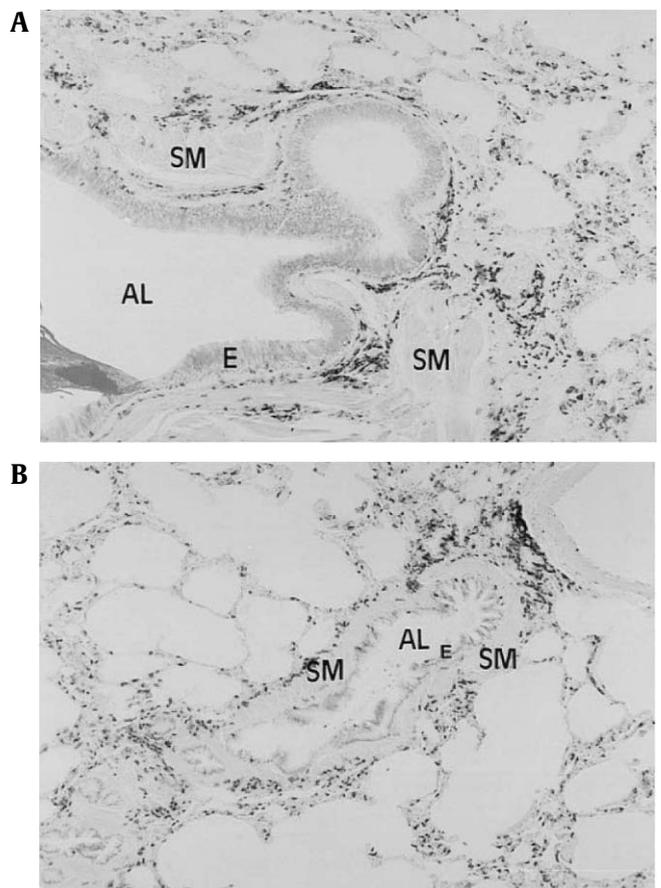


Figura 1 Inflamación de la vía aérea en el asma: marcado de leucocitos CD45 en la vía aérea de un paciente asmático. A) Vía aérea grande. B) Vía aérea pequeña donde se puede apreciar un patrón "externo" de distribución de células inflamatorias. Modificado de Haley et al¹⁹. AL: luz bronquial (*airway lumen*); E: epitelio (*epithelium*); SM: músculo liso (*smooth muscle*).

El AN ha sido un modelo estudiado mediante biopsias transbronquiales por el grupo de Kraft. En sus trabajos demostraron inflamación alveolar en pacientes con AN, que no está presente en aquellos asmáticos sin síntomas nocturnos⁶. Los pacientes con AN tienen un mayor número de eosinófilos por volumen de pulmón en su parénquima pulmonar a las 4:00 am cuando se compara con pacientes sin AN, y un mayor número de eosinófilos y macrófagos en su tejido alveolar a las 4:00 am que a las 4:00 pm. Además, en estos pacientes, sólo la eosinofilia alveolar y de la VAP, y no la eosinofilia de la vía aérea central, se correlacionaba con una reducción de la función pulmonar (volumen espiratorio máximo en el primer segundo [FEV₁]) a las 4:00 am y con el número de eosinófilos activados (EG2+) en los alvéolos²¹. En este mismo grupo de pacientes con AN se encontró una reducción de la afinidad de los receptores para los glucocorticoides, una reducción de la proliferación de las células sanguíneas mononucleares y una menor respuesta a esteroides a las 4:00 am cuando se compara con pacientes sin AN²². Todos estos datos sugieren que el incremento de células CD4+ en el tejido alveolar de pacientes con AN, la disminución de la afinidad de los receptores para los glucocorticoides y una menor respuesta a los glucocorticoides pueden causar un incremento de migración de eosinófilos y exacerbaciones de síntomas en pacientes con AN.

Wenzel et al²³ demostraron, mediante biopsias transbronquiales, inflamación persistente de la VAP y vía aérea proximal en pacientes con asma grave corticodependiente. Aunque en su trabajo el número de eosinófilos de la vía aérea era similar entre pacientes con asma grave y controles sanos, los pacientes asmáticos con enfermedad grave tenían un mayor número y porcentaje de neutrófilos en el lavado broncoalveolar y muestras de biopsias endobronquiales y transbronquiales comparándolo con pacientes con enfermedad leve o moderada, a pesar de recibir tratamiento agresivo con corticoides. Recientemente, se ha acumulado evidencia de que en la vía aérea de pacientes con asma grave, tanto central como periférica, existen otros subtipos celulares de linfocitos, entre los que destacan los Th17, productores de citocinas con capacidad quimiotáctica para neutrófilos, lo que podría explicar la pobre respuesta a los corticoides y la neutrofilia que se detecta en este grupo de pacientes²⁴.

También se ha demostrado remodelación en la VAP. Se ha detectado depósito de colágeno, laminina, tenascina, fibronectina y proteoglicanos en la pared de la vía aérea, lo que da lugar a fibrosis subepitelial y engrosamiento de la vía aérea, cambios que se relacionan positivamente con la respuesta a metacolina. Bergeron et al²⁵ mostraron la existencia de fibrosis subepitelial e incremento en la masa muscular en la VAP de pacientes asmáticos, pero no pudieron encontrar despegamiento epitelial. También vieron que la masa de músculo liso bronquial en la VAP puede reducirse en respuesta al tratamiento²⁵. Estos datos fueron confirmados por otros autores que detectan un incremento del grosor de la submucosa, la adventicia y las capas musculares en la VAP de los pacientes asmáticos^{26,27}. Más recientemente, Dolhnikoff et al²⁸, estudiando autopsias de pacientes muertos por asma mediante técnicas inmunohistoquímicas, demostraron que la VAP es un lugar de gran remodelación en este grupo de pacientes, mayor incluso que la vía aérea central. Estos autores demuestran el depósito de colágeno tipo I, fibronectina y metaloproteinas 9 de forma significativa en pacientes asmáticos que afecta de forma preferente a la parte más externa de la VAP, llegando incluso a afectar al parénquima peribronquiolar (fig. 2). Si este hecho es relevante en el fenómeno inflamatorio del asma o si tiene un papel protector/estabilizador de la VAP es una materia que debe debatirse²⁹.

Se ha especulado sobre la repercusión funcional de la inflamación y remodelación de la VAP en el asma bronquial y su contribución a la obstrucción del flujo respiratorio característica de la enfermedad. La inflamación de la VAP puede causar un desacoplamiento del parénquima y de la vía aérea debido a la interdependencia mecánica entre esos dos compartimentos, dando lugar a fallos en los mecanismos globales de regulación del flujo aéreo en los pacientes asmáticos. Wiggs et al³⁰ demostraron que un incremento moderado en el grosor de la VAP, el cual ejerce un efecto pequeño sobre la resistencia basal, puede afectar profundamente al estrechamiento de la vía aérea causado por la contracción del músculo liso bronquial. Estudios experimentales realizados en músculo liso aislado de bronquios animales y humanos muestran un incremento de la respuesta contráctil de la VAP comparado con la vía grande, tanto a estímulos inespecíficos (acetilcolina)³¹ como específicos³². El exudado inflamatorio de la VAP puede alterar la composición del surfactante, lo que favorece el colapso de la misma³³, con el consiguiente atrapamiento aéreo y aumento del volumen residual. La combinación de estrechamiento de la VAP y pérdida de la elasticidad pulmonar puede aumentar la respuesta bronquial en la VAP, especialmente en pacientes poco respondedores a tratamiento broncodila-

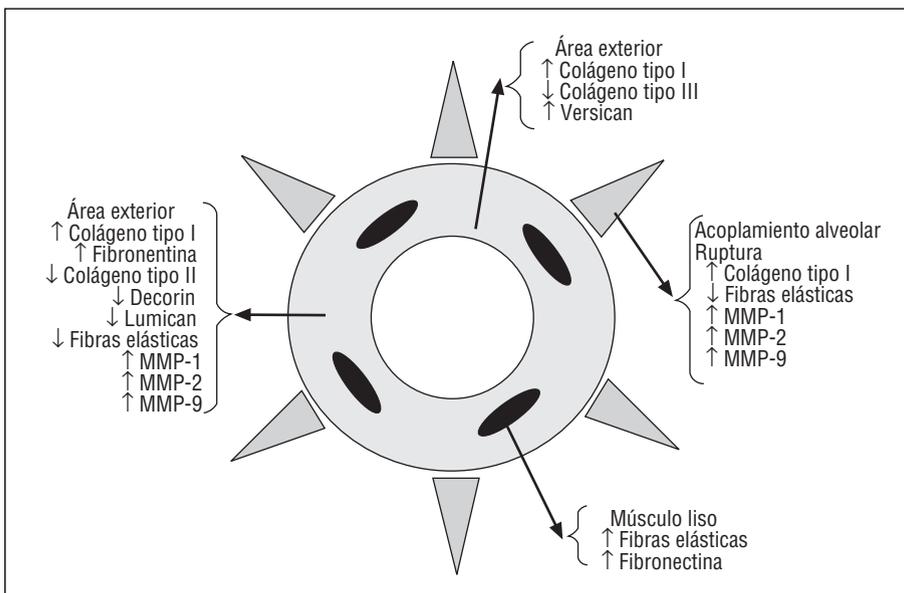


Figura 2 Se representan diferencias entre pacientes con asma fatal y controles en la composición de la matriz extracelular y datos de remodelamiento en la pequeña vía aérea obtenida en distintos estudios. Tomado de Dolhnikoff et al²⁸.

tador¹⁴. Tomados en su conjunto, estos datos sugieren que la contribución de la VAP a la obstrucción y al aumento de la resistencia pulmonar en el paciente asmático se ha subestimado.

Desafortunadamente, no contamos con un marcador biológico ampliamente aceptado que mida de forma distintiva y no invasiva el proceso inflamatorio en la VAP. Es más, aunque hay parámetros que se han asociado de una manera transversal con la presencia de la enfermedad cuando comparamos entre sanos y enfermos o con niveles de gravedad de la enfermedad^{34,35}, no hay estudios longitudinales que muestren que los cambios o modulación de estos biomarcadores alteren los resultados de ambas condiciones. En la actualidad, el óxido nítrico (NO) en aire exhalado en el marcador biológico más extensamente utilizado. Si se determina con varios flujos espiratorios, puede ser un marcador de inflamación del pulmón distal, de hecho se demostró que la concentración alveolar de NO se incrementa en pacientes que presentan asma con distintos niveles de gravedad³⁶, y es especialmente elevado en pacientes con asma más grave, a pesar de estar estables y seguir tratamiento con corticoides inhalados³⁷. Sin embargo, sus valores no se correlacionan con otros parámetros de función respiratoria que miden la VAP y otros autores no han encontrado esta relación^{35,38}, por lo que se necesitan estudios longitudinales que confirmen su utilidad como marcador de inflamación en la VAP.

Modelación experimental de asma en animales

Las observaciones realizadas en humanos asmáticos, bien a través de estudios observacionales o ensayos clínicos, han proporcionado descripciones detalladas de los aspectos de inflamación y remodelación de las vías respiratorias en el asma y su relación con la evolución clínica de la enfermedad. Sin embargo, los estudios en humanos no permiten determinar los mecanismos de la inflamación y remodelación, y su asociación con variables funcionales respiratorias, hasta el nivel de entendimiento requerido para la identificación de potenciales dianas terapéuticas. Los modelos animales de enfermedad, de asma en este caso, son necesarios para someter a prueba las hipótesis que surgen de los datos clínicos obtenidos en humanos y, a la vez, para generar y verificar hipótesis mecanísticas generadas por los propios modelos animales, que de una manera más específica se centran sobre aspectos celulares y moleculares. Los modelos animales facilitan un grado profundo de exploración experimental, al mismo tiempo que preservan la fisiología en el organismo completo. Son por ello modelos integradores en los que se puede estudiar la relevancia clínica para la enfermedad humana, de los mecanismos celulares y moleculares y de intervenciones terapéuticas específicas sobre ellos. Asimismo, los resultados de estudios *in vitro* que diseccionan los mecanismos celulares y moleculares de enfermedad al nivel más fino posible pueden someterse a prueba para la comprobación de su relevancia biológica, en los modelos animales de enfermedad.

Para la modelación experimental de asma se han empleado diversas especies, incluidos el ratón, la rata, los conejos de indias, la oveja y el gato. Existen dos especies, el gato y el caballo, que pueden espontáneamente desarrollar enfermedad inflamatoria y obstructiva de las vías respiratorias comparable con el asma humana en muchos aspectos. Sin embargo, a pesar de la diversidad de especies utilizadas, la gran mayoría de los estudios de modelación experimental de asma se han realizado en el ratón y la rata. Estas especies tienen la ventaja de su coste-efectividad en cuanto a la reproducción y mantenimiento de estos animales, y el tamaño muestral que facilitan para los estudios.

Los modelos en ratón^{39,40} permiten emplear animales genéticamente modificados (transgénicos y *knockout*), los cuales se han explotado extensamente para estudiar el papel de diversos mediadores (citocinas, factores de crecimiento) en la inflamación de vías respiratorias. Sin embargo, el aparato respiratorio murino difiere del humano de forma significativa en una serie de aspectos anatómicos y fisiológicos que deben tenerse en cuenta a la hora de realizar la traslación de resultados de los modelos experimentales. En primer lugar, los ra-

tones tienen en su aparato respiratorio circulación pulmonar exclusivamente; no tienen circulación bronquial sistémica. Esta diferencia necesariamente modifica las rutas de tráfico leucocitario en la inflamación de vías respiratorias. De hecho, la infiltración inflamatoria perivascular es característica del asma experimental murina, lo cual es una diferencia sustancial con el asma humana. En segundo lugar, la arborización y la distribución de las vías respiratorias de conducción intrapulmonar difieren asimismo del aparato respiratorio humano. En el ratón, el árbol respiratorio intrapulmonar tiene menos generaciones y existe un importante grado de conservación del diámetro, de modo que las vías respiratorias más distales tienen un diámetro relativamente grande respecto a las primeras generaciones del árbol. Únicamente existe cartílago hasta el nivel de los bronquios lobares, de modo que la casi totalidad de las vías respiratorias intrapulmonares son bronquiolos, con un patrón de bifurcación monopodial (ramificación lateral) en vez de bifurcación dicotómica⁴¹. Todos estos factores contribuyen a que los mecanismos de obstrucción al flujo aéreo en el ratón con asma experimental puedan diferir de los humanos, probablemente de un modo especial en lo que concierne al papel de la VAP.

La rata⁴² es un animal de tamaño y masa aproximadamente 10 veces superiores a los del ratón y está situada sobre un umbral de organización anatómica y fisiológica significativamente más cercana a la humana. En la rata existe circulación bronquial sistémica y la configuración anatómica e histológica de las vías respiratorias tiene mayor analogía con la humana. Sin embargo, la rata tiene el inconveniente de que, al contrario que en el ratón, resulta poco coste-efectiva la generación de animales transgénicos para estudios funcionales de sobreexpresión o silenciamiento genético. En esta especie, la cepa *Brown Norway* es particularmente susceptible al desarrollo de respuestas inmunitarias tipo Th2 frente a la sensibilización alérgica. Como resultado, esta cepa ha resultado de gran utilidad para modelar asma alérgica, con reproducción de los fenómenos de respuesta alérgica inmediata y tardía de vías respiratorias, e hiperreactividad bronquial frente a agonistas colinérgicos tales como metacolina o carbacol. Asimismo, se han reproducido exitosamente los distintos componentes histopatológicos de la remodelación de vías respiratorias, tales como la fibrosis subepitelial por incremento de deposición de matriz extracelular, incremento de la masa de músculo liso de vía respiratoria con hiperplasia de miocitos, y cambios fenotípicos de las células musculares lisas en asociación con hiperreactividad bronquial.

Sinopsis metodológica

La forma más directa de inducir asma experimental en roedores consiste en la sensibilización alérgica seguida de una fase de provocación antigénica en vía respiratoria³⁹. El procedimiento de sensibilización tradicionalmente más utilizado consiste en inyectar una suspensión de ovoalbúmina adsorbida sobre un coadyuvante (habitualmente hidróxido de aluminio) vía intraperitoneal o subcutánea. Dado que este procedimiento se desvía de la forma natural de sensibilización a aeroalérgenos en la enfermedad humana, se tiende actualmente a inducir sensibilización mediante la administración directa y repetida en vía respiratoria de antígenos que actúen como aeroalérgenos en los humanos, utilizando para ello preparados tales como extractos de ácaros del polvo doméstico⁴³. Tras la sensibilización, la fase de provocación antigénica de la vía respiratoria se realiza mediante distintos métodos, tales como instilación intranasal directa, administración de aerosoles vía intubación orotraqueal, o exposición a aerosoles en cámara libre. Los protocolos de administración varían según los objetivos del estudio. En general, la broncoprovocación antigénica repetida tras sensibilización da lugar al desarrollo de hiperreactividad bronquial, infiltración inflamatoria de las vías respiratorias con presencia de eosinófilos, células T y mastocitos, más los cambios estructurales propios de la remodelación de vías respiratorias. Los modelos en roedores también han permitido realizar estudios de transferencia adop-

tiva de células T. En estos estudios, se purifican células T CD4+ de donantes sensibilizados y se transfieren a receptores no sensibilizados, los cuales se someten a broncoprovocación antigénica. Este tipo de abordaje permite estudiar el papel de las células T en el asma. Los animales receptores desarrollan en este caso, dirigido por las células T transferidas de los donantes, respuestas alérgicas tardías específicas, hiperreactividad bronquial, inflamación eosinofílica y remodelación de vías respiratorias, en ausencia de respuestas alérgicas inmediatas y mecanismos dependientes de inmunoglobulina E.

Los estudios de mecánica y función pulmonar pueden realizarse mediante diferentes métodos que abarcan desde procedimientos pleustomográficos repetibles hasta mediciones invasivas bajo anestesia profunda, bloqueo neuromuscular y ventilación mecánica. Tras la generación de datos de función pulmonar in vivo, se puede obtener, para su análisis posterior, muestras biológicas tales como lavado broncoalveolar (sedimento celular y sobrenadante para determinación de factores solubles), suero o plasma, más los pulmones inflados a presión estandarizada con un fijador. La conservación de tales muestras permite posteriormente llevar a cabo estudios de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, morfología cuantitativa, análisis de expresión genética, etc.

Análisis de la vía aérea pequeña en el asma experimental

Los modelos animales de asma permiten analizar el papel de la VAP sin las limitaciones metodológicas a las que está sometida la obtención de datos clínicos en humanos, pero no debiendo dejar de tener presente la potencial importancia que para la traslación de conclusiones pueden tener las diferencias anatómicas, histológicas y fisiológicas reseñadas previamente; especialmente en el caso de los modelos en roedores, en los cuales se genera la gran mayoría de los datos. La modelación experimental en animales ha permitido estudiar el papel de la VAP desde el punto de vista de la función pulmonar in vivo, así como en lo que se refiere a la distribución de la inflamación y remodelación desde el punto de vista histopatológico.

Los procedimientos invasivos de estudio de función pulmonar mediante técnica de oscilación forzada bajo ventilación mecánica (p. ej., equipo FlexiVent®, SciReq, Montreal) permiten obtener mediciones diferenciadas de un componente de resistencia de vía respiratoria proximal (resistencia newtoniana) y un componente de resistencia periférica que incluye la VAP (descarga tisular [*tissue dumping*], G)⁴⁴. Para las mediciones de reactividad bronquial mediante este tipo de equipo y técnica, se utilizó en distintos estudios metacolina administrada por vía intravenosa, o bien administrada en la vía respiratoria mediante un nebulizador acoplado a la rama inspiratoria del ventilador. En el caso de la metacolina inhalada, procedimiento más cercano a las pruebas de hiperreactividad bronquial en humanos, se encontró que el impacto sobre la función pulmonar era mayor en la VAP que con la metacolina por vía intravenosa⁴⁵. Esta capacidad de la técnica de oscilación forzada para discriminar entre componentes central y periférico de la resistencia se empleó en otros estudios que en conjunto reflejan un papel relevante de la VAP en el impacto del asma experimental sobre la función pulmonar. En un estudio sobre la arginasa, una familia de enzimas implicadas en la producción de NO, se realizó inhibición de la misma en dos modelos murinos de inflamación de vías respiratorias inducida por sensibilización a ovoalbúmina: un modelo "agudo" de corta duración, y un modelo "crónico" basado en exposición prolongada⁴⁶. En el modelo "agudo", la inhibición de arginasa atenuó la respuesta a metacolina en las vías respiratorias centrales. Sin embargo, en el modelo "crónico", que cursó con remodelación de vías respiratorias y generó un fenotipo de asma experimental de mayor analogía al asma humana, el efecto funcional de la inhibición de arginasa se extendió a la VAP. También en un modelo en ratón, el bloqueo de receptores H4 de histamina atenuó la hiperreactividad en la vía respiratoria central y la VAP⁴⁷.

Diversos estudios generaron datos histopatológicos sobre la distribución de los infiltrados inflamatorios en el asma experimental. Aunque en la mayoría de estos trabajos el objetivo no fue un análisis cuantitativo y comparativo de la inflamación entre vía respiratoria central y VAP, los estudios en su conjunto constatan la presencia de infiltración inflamatoria en la VAP. Uno de los primeros estudios que documentó la presencia de infiltrados inflamatorios en la VAP, en el contexto de un análisis sobre respuesta alérgica temprana y tardía, empleó para ello un meticuloso procedimiento de disección de vía respiratoria proximal frente a VAP/parénquima⁴⁸. Este trabajo se siguió de otros donde se halló inflamación en VAP, en el contexto, respectivamente, de estudios de respuesta a dexametasona⁴⁹, de inhibición de inflamación por bloqueo de integrinas VLA-4 (very late activation antigen-4) y LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)⁵⁰, de depleción de células T CD8+⁵¹, y de inhalación de partículas ambientales ultrafinas como simulación de la exposición al tráfico rodado⁵². En otro estudio donde se comparó un modelo de corta duración con otro crónico y se realizó cuantificación diferenciada de eosinófilos y linfocitos en la vía respiratoria proximal frente a VAP, se encontró afectación a ambos niveles, pero la carga de eosinófilos derivó de ser predominante en vía proximal en el modelo corto a ser más intensa en la VAP en el modelo crónico, que refleja más cercanamente el asma humana⁵³. En cierto contraste con estos datos, la exposición crónica de bajo nivel al alérgeno no se acompañó en otro trabajo de infiltración inflamatoria obvia en la VAP, pero la simulación de "exacerbación asmática" mediante un incremento abrupto de la exposición sobre el nivel crónico de base condujo a un aumento de la carga inflamatoria de predominio en VAP⁵⁴. Estos datos sobre diferencias de carga inflamatoria entre vía respiratoria proximal y VAP, y sobre deriva de la predominancia según el tiempo e intensidad de la exposición, pueden reflejar mecanismos de regulación local del reclutamiento leucocitario. De hecho, en un estudio sobre el reclutamiento de células T a la pared de las vías respiratorias, se encontró reclutamiento en todos los tamaños, pero en ratas *knockout* para CD26, un receptor implicado en el tráfico linfocitario, el efecto en la inhibición del reclutamiento fue sólo en vías respiratorias grandes y medianas, no en VAP, lo que sugiere que existen mecanismos de reclutamiento regional selectivo de células inflamatorias que varían según el tamaño de la vía aérea⁵⁵. Por último, algunos estudios prestaron especial atención a la distribución de mastocitos en modelos experimentales de asma. En un estudio sobre respuesta alérgica tardía se encontraron más mastocitos en vías respiratorias proximales y medianas que en la VAP⁵⁶; sin embargo, en otro estudio la broncoprovocación crónica con alérgeno durante 3 meses indujo acumulación de mastocitos, mediante un mecanismo dependiente de IL-9, en las vías respiratorias de todos los tamaños⁵⁷.

La remodelación de vías respiratorias, conjunto de cambios estructurales que se desarrollan en asociación a la inflamación crónica, es el aspecto del asma que algunos estudios han analizado más rigurosamente en cuanto a su distribución por tamaño de las vías en modelos experimentales. Los datos obtenidos no son homogéneos, dependiendo probablemente en parte de diferentes protocolos de estudio y procedimientos de análisis, pero en general los distintos estudios convergen en que la VAP está afectada por la remodelación en el asma experimental. Un estudio temprano sobre remodelación en la rata, donde se midió el grosor total de la pared de la vía respiratoria en asociación a la respuesta alérgica inmediata tras una broncoprovocación simple, detectó un incremento del grosor total de la pared bronquiolar en la VAP únicamente⁵⁸. En un estudio posterior con utilización de un modelo "crónico", se encontró remodelación tanto en vía respiratoria proximal como en la VAP⁵³. En algunos estudios se analizó la distribución de componentes específicos de la remodelación, particularmente de la fibrosis subepitelial y el crecimiento del músculo liso. En el caso de la fibrosis subepitelial, por incremento de la masa de matriz extracelular, se realizaron mediciones del depósito de proteoglicanos y se encontró que este aspecto de la remodelación era más prominente en vía respiratoria proximal. En otro estudio en el que se realizó un análisis

sis exhaustivo de distribución de componentes de la remodelación⁵⁹, se observó un incremento de músculo liso en vías respiratorias de todos los tamaños. Sin embargo, el depósito subepitelial de colágeno y fibronectina estaba ausente en la VAP, lo que muestra, en coincidencia con el estudio de Pini et al, que la fibrosis subepitelial es un aspecto de la remodelación que se presenta predominantemente en la vía respiratoria proximal. Respecto al incremento de la masa de músculo liso, aspecto que se considera clave en la mecánica de la hiperreactividad bronquial y la obstrucción al flujo aéreo, los datos han experimentado una evolución histórica asociada a los desarrollos tecnológicos en morfología cuantitativa. Utilizando la rata *Brown Norway* como modelo, los datos más antiguos reflejaban una masa de músculo liso y número de células musculares lisas en proliferación aumentados en vías respiratorias grandes y medianas, pero no en la VAP⁶⁰. En este estudio, las mediciones se obtuvieron trazando manualmente sobre papel los contornos de los haces de músculo liso mediante un acoplamiento de tipo "cámara lúcida" que permitía la visión superpuesta de la imagen en el microscopio y el dibujo, utilizando para ello preparaciones teñidas mediante una técnica histoquímica (hematoxilina-floxina-azafrán) de resultado variable. La imprecisión de este sistema limitaba probablemente su sensibilidad para detectar cambios en la VAP. En otros estudios más recientes en rata⁶¹ y ratón⁶², se realizó la extracción digital de la imagen inmunofluorescente del tejido contráctil de la vía respiratoria, detectado mediante un anticuerpo monoclonal contra α -actina de músculo liso (fig. 3). En el estudio en la rata⁶¹, la inducción

de asma experimental mediante transferencia adoptiva de células T CD4+ efectoras resultó en un incremento de la masa de músculo liso que se hacía progresivamente más importante a medida que las vías respiratorias eran más distales (fig. 4). Esta tendencia fue coincidente con los datos obtenidos en un estudio subsiguiente sobre enfermedad alérgica obstructiva equina (*heaves*)⁶³. En el estudio en ratón, sin embargo, los cambios afectaron a las vías respiratorias de todos los tamaños de forma homogénea (fig. 5)⁶². Las diferencias anatómicas y fisiológicas comentadas previamente entre el ratón y especies de mayor masa pueden hacer que el árbol respiratorio del ratón no represente adecuadamente un gradiente completo de tamaño de las vías respiratorias y no resulte suficientemente sensible para detectar determinadas diferencias según tamaño.

Conclusión

Existe evidencia múltiple a partir de datos obtenidos en humanos que confirma la inflamación y remodelación de la VAP en el asma. Su significado clínico no se conoce con exactitud, pero es probable que tenga gran relevancia en el control de la enfermedad. Por su parte, los modelos animales de asma permiten explorar experimentalmente la biología de la VAP, en ciertas diferencias anatómicas y fisiológicas que deben conocerse y tenerse en cuenta a la hora de trasladar datos y conclusiones al asma humana. En general, los resultados obtenidos de modelos animales sugieren, en consistencia con los datos clínicos hu-

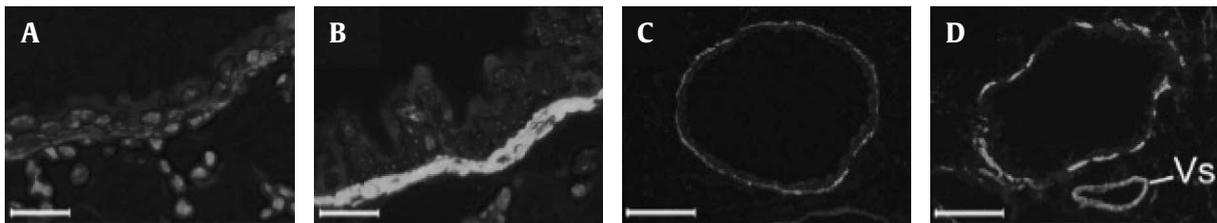


Figura 3 Inmunofluorescencia para α -actina de músculo liso (α -SMA, señal verde) y contracción nuclear (azul) en secciones pulmonares, para la medición mediante procesamiento digital de imagen de la masa de tejido contráctil de la vía respiratoria. A y B) Ratones de los grupos control y OVA, respectivamente; en el último se observa el engrosamiento de la capa de músculo liso. C y D) Extracción de la señal de α -SMA para la medición de la masa de tejido contráctil; ratones de los grupos control y OVA, respectivamente. En (P) se muestra también músculo liso vascular (Vs), que se excluye de las mediciones. Reproducido con permiso de Elsevier: Fraga-Iriso et al⁶².

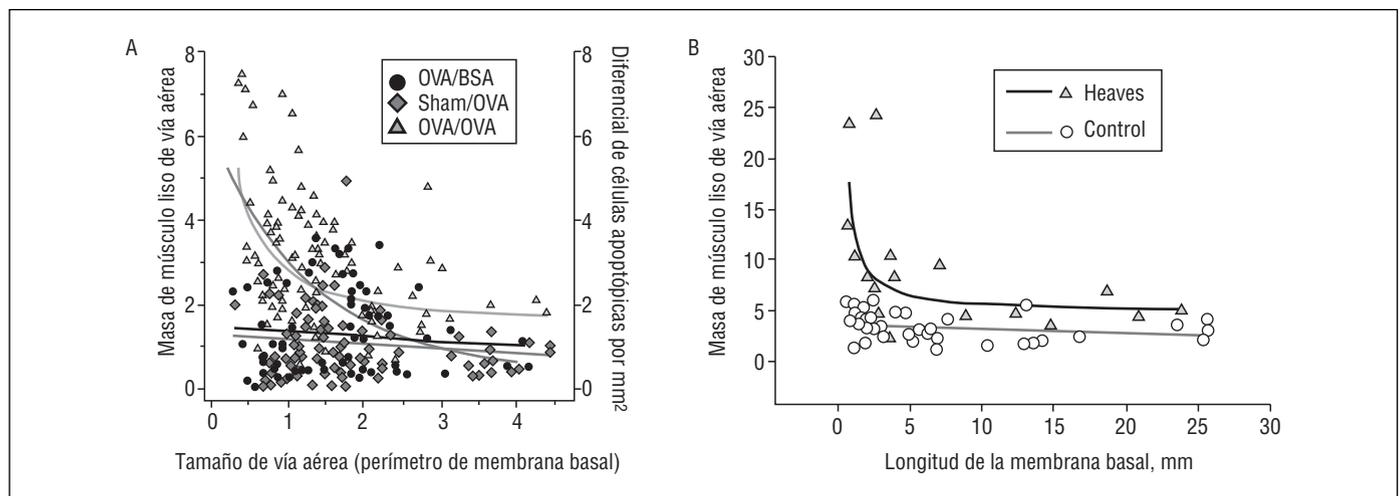


Figura 4 Incremento de la masa de músculo liso según tamaño de la vía respiratoria. A) Modelo de asma experimental en rata. En animales control, la cantidad de músculo liso relativa al tamaño de la vía respiratoria es aproximadamente una constante a lo largo de las vías respiratorias intrapulmonares (rectas de regresión lineales). Estos animales habían sido receptores células T CD4+ de animales sensibilizados a ovoalbúmina y broncoprovocados con vehículo (grupo OVA/BSA), o habían recibido células T CD4+ de animales falsamente sensibilizados y había sido broncoprovocados con ovoalbúmina (grupo Sham/OVA). Los animales con asma experimental, receptores de células T CD4+ antígeno-específicas para ovoalbúmina y broncoprovocados con ovoalbúmina (grupo OVA/OVA, curva de regresión exponencial gris pálido), presentaron un incremento de músculo liso en vías respiratorias de todos los tamaños pero con mayor crecimiento relativo en la vía aérea pequeña (VAP). El número de células apoptóticas (curva exponencial gris oscuro, eje derecho) se incrementó asimismo progresivamente en la VAP. B) remodelación del músculo liso en caballos con enfermedad alérgica obstructiva (*heaves*). En analogía al modelo experimental en rata, el músculo liso crece en las vías respiratorias de todos los tamaños en los caballos con *heaves*, pero con mayor crecimiento relativo en la VAP. Reproducido con permiso de la American Society for Clinical Investigation, Ramos-Barbón et al⁶¹ (panel A) y Elsevier, Herszberg et al⁶³ (panel B).

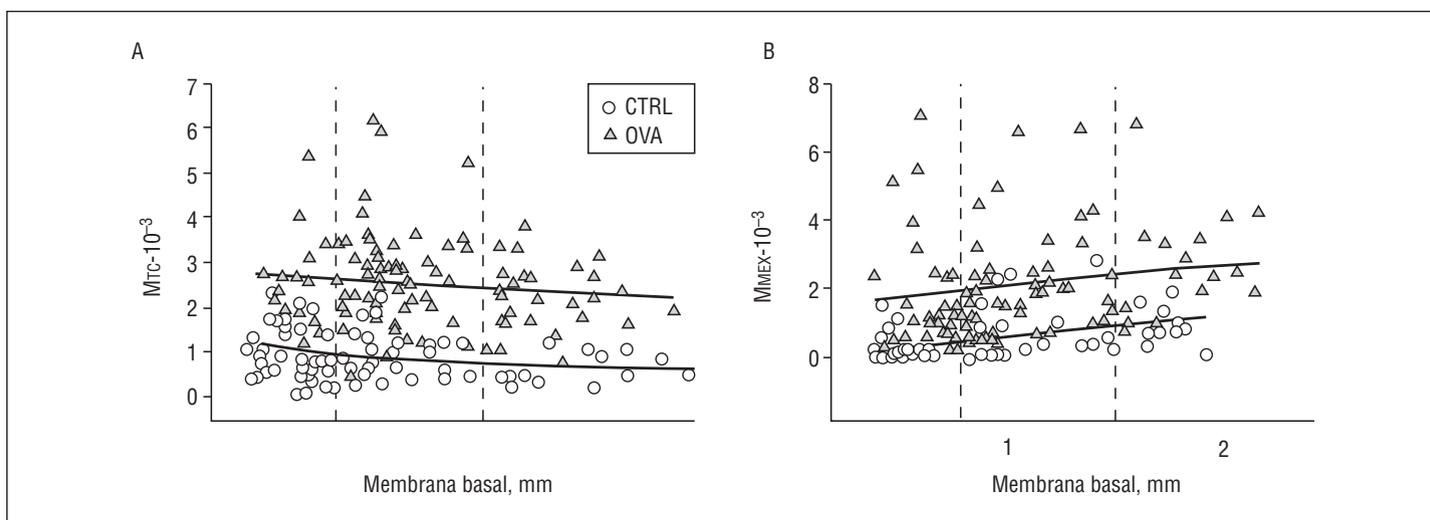


Figura 5 Patrón de incremento de la masa de tejido contráctil de vía respiratoria (MTC, panel A) y masa de matriz extracelular (MMEX, panel B) en el ratón con asma experimental. El tejido contráctil crece de forma aproximadamente homogénea en las vías respiratorias de todos los tamaños, mientras que la deposición de matriz extracelular muestra una tendencia de significación estadística *borderline* ($p = 0,051$) a ser más prominente a mayor tamaño de las vías respiratorias. Reproducido con permiso de Elsevier, Fraga-Iriso et al⁶².

manos, que la VAP está implicada de forma importante en la fisiopatología del asma a través de su afectación por la inflamación y remodelación. Distintos aspectos de la remodelación pueden distribuirse de forma diferente y algunos conjuntos de datos sugieren que la fibrosis subepitelial puede predominar en vía respiratoria proximal, mientras que el crecimiento hiperplásico del músculo liso, de importancia central en el mecanismo de la hiperreactividad bronquial y la obstrucción al flujo aéreo, puede cobrar mayor importancia relativa en la VAP. Estas diferencias pueden tener implicaciones en el diseño de estrategias terapéuticas. Es posible que la inflamación mal controlada de la VAP, no accesible fácilmente al tratamiento antiinflamatorio por vía inhalatoria, pueda contribuir a un deterioro sostenido de la función pulmonar asociado a remodelación. Por ello, es probablemente importante que el tratamiento antiinflamatorio sea capaz de alcanzar esta diana terapéutica para un manejo óptimo de la enfermedad.

Puntos clave

- En el asma existe inflamación y remodelación que afecta a todo el tracto respiratorio e incluso el parénquima pulmonar.
- Este proceso inflamatorio existe independientemente de la gravedad del asma.
- La obstrucción de la vía aérea pequeña (VAP) puede contribuir de forma significativa al decremento de la función respiratoria y remodelación de la vía aérea, y puede ser responsable de la falta de control de la enfermedad.
- Faltan marcadores biológicos ampliamente aceptados que ayuden a monitorizar el proceso inflamatorio en la VAP.
- Los modelos animales de asma permiten explorar experimentalmente la biología de la VAP.
- Los datos de modelos animales indican que la VAP está implicada de forma importante en la fisiopatología del asma a través de su afectación por la inflamación y remodelación.
- Según modelos animales, distintos aspectos de la remodelación pueden distribuirse de forma diferente: la fibrosis subepitelial puede predominar en vías centrales y medianas, mientras que el crecimiento del músculo liso puede cobrar mayor importancia relativa en la VAP.
- Estas diferencias, de confirmarse en humanos, pueden tener implicaciones en el diseño de estrategias terapéuticas.
- Es probablemente importante que el tratamiento antiinflamatorio sea capaz de alcanzar la VAP para un manejo óptimo del asma.

Conflicto de intereses

El Dr. Parra-Arrondo ha recibido financiación de soporte para la asistencia a reuniones y congresos, y/o remuneración por conferencias no comerciales, de GlaxoSmithKline (GSK), AstraZeneca, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Almirall, Leti, ALK-Abelló, Bial-Aristegui y Stallergenes. El Dr. Ramos Barbón ha recibido financiación de soporte para la asistencia a reuniones y congresos, y/o remuneración por conferencias no comerciales, de GlaxoSmithKline, AstraZeneca, Merck Sharp & Dohme, Boehringer Ingelheim, Novartis, Almirall y Chiesi Pharmaceuticals; ha recibido remuneración por consultoría en panel experto de GSK; es receptor de financiación operativa para investigación (*investigator-driven grant*) de GSK, y es investigador en ensayos clínicos de Novartis, AstraZeneca y Amgen.

Bibliografía

1. Levine G, Housley E, MacLeod P, Macklem PT. Gas exchange abnormalities in mild bronchitis and asymptomatic asthma. *N Engl J Med.* 1970;282:1277-82.
2. Despas PJ, Leroux M, and Macklem PT. Site of airway obstruction in asthma as determined by measuring maximal expiratory flow breathing air and a helium-oxygen mixture. *J Clin Invest.* 1972;51:3235-43.
3. Green M. How big are the bronchioles? *St Thomas Hospital Gazette.* 1964;62:136-9.
4. Mead J. The lung's "quiet zone". *N Engl J Med.* 1970;282:1318-9.
5. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100:44-51.
6. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1505-10.
7. Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:51-6.
8. Bacsi A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:844-50.
9. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:386-90.
10. Taha RA, Minshall EM, Miotto D, Shimbara A, Luster A, Hogg JC, et al. Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:476-83.
11. Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, Chung KF, Barnes PJ. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:771-82.
12. Tulic MK, Hamid Q. The role of the distal lung in asthma. *Semin Respir Crit Care Med.* 2002;23:347-59.
13. Yanai M, Sekizawa K, Ohru T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol.* 1992;72:1016-23.

14. Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, Liu MC. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:447-52.
15. Tulic MK, Hamid Q. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Clin Chest Med.* 2006;27:41-52.
16. Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J.* 1997;10:292-300.
17. Faul JL, Tormey VJ, Leonard C, Burke CM, Farmer J, Horne SJ, et al. Lung immunopathology in cases of sudden asthma death. *Eur Respir J.* 1997;10:301-7.
18. Hamid QA. Peripheral inflammation is more important than central inflammation. *Respir Med.* 1997;91 Suppl A:11-2.
19. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ, et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:565-72.
20. Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:138-43.
21. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:228-34.
22. Kraft M, Vianna E, Martin RJ, Leung DY. Nocturnal asthma is associated with reduced glucocorticoid receptor binding affinity and decreased steroid responsiveness at night. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:66-71.
23. Wenzel SE, Szefler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:737-43.
24. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1185-7.
25. Bergeron C, Hauber HP, Gottfried M, Newman K, Dhanda R, Servi RJ, et al. Evidence of remodeling in peripheral airways of patients with mild to moderate asthma: effect of hydrofluoroalkane-flunisolide. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:983-9.
26. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:720-6.
27. Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1220-5.
28. Dolhnikoff M, Da Silva LF, De Araujo BB, Gomes HA, Fernezlian S, Mulder A, et al. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1090-7.
29. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:1-6.
30. Wiggs BR, Bosken C, Pare PD, James A, Hogg JC. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:1251-8.
31. Mitchell HW, Cvetkovski R, Sparrow MP, Gray PR, McFawn PK. Concurrent measurement of smooth muscle shortening, lumen narrowing and flow to acetylcholine in large and small porcine bronchi. *Eur Respir J.* 1998;12:1053-61.
32. Ellis JL, Hubbard WC, Meeker S, Udem BJ. Ragweed antigen E and anti-IgE in human central versus peripheral isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:717-23.
33. Kraft M. The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J.* 1999;14:1403-17.
34. Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med.* 1978;298:1277-81.
35. Van Veen IH, Sterk PJ, Schot R, Gauw SA, Rabe KF, Bel EH. Alveolar nitric oxide versus measures of peripheral airway dysfunction in severe asthma. *Eur Respir J.* 2006;27:951-6.
36. Brindicci C, Ito K, Resta O, Pride NB, Barnes PJ, Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J.* 2005;26:52-9.
37. Verbanck S, Schuermans D, Vincken W. Inflammation and airway function in the lung periphery of patients with stable asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:611-6.
38. Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J.* 2005;25:986-91.
39. Ramos-Barbón D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2004;27:3-22.
40. Torres R, Picado C, De Mora F. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:141-52.
41. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:572-7.
42. Martin JG, Ramos-Barbón D. Airway smooth muscle growth from the perspective of animal models. *Resp Physiol Neurobiol.* 2003;137:251-61.
43. Torres R, Picado C, De Mora F. Again an asthma model. but a useful one. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:419-21.
44. Bates JH, Rincón M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297:L401-10.
45. Jonasson S, Hedenstierna G, Hedenstrom H, Hjoberg J. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;165:229-36.
46. North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasmann H, Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296:L911-20.
47. Cowden JM, Riley JP, Ma JY, Thurmond RL, Dunford PJ. Histamine H4 receptor antagonism diminishes existing airway inflammation and dysfunction via modulation of Th2 cytokines. *Respir Res.* 2010;11:86.
48. Renzi PM, Olivenstein R, Martin JG. Inflammatory cell populations in the airways and parenchyma after antigen challenge in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:967-74.
49. Renzi PM, Olivenstein R, Martin JG. Effect of dexamethasone on airway inflammation and responsiveness after antigen challenge of the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:932-9.
50. Laberge S, Rabb H, Issekutz TB, Martin JG. Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:822-9.
51. Laberge S, Wu L, Olivenstein R, Xu LJ, Renzi PM, Martin JG. Depletion of CD8+ T cells enhances pulmonary inflammation but not airway responsiveness after antigen challenge in rats. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98:617-27.
52. Li N, Harkema JR, Lewandowski RP, Wang M, Bramble LA, Gookin GR, et al. Ambient ultrafine particles provide a strong adjuvant effect in the secondary immune response: implication for traffic-related asthma flares. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299:L374-83.
53. Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, et al. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1263-71.
54. Siegle JS, Hansbro N, Herbert C, Yang M, Foster PS, Kumar RK. Airway hyperreactivity in exacerbation of chronic asthma is independent of eosinophilic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35:565-70.
55. Schade J, Schmiedl A, Kehlen A, Veres TZ, Stephan M, Pabst R, et al. Airway-specific recruitment of T cells is reduced in a CD26-deficient F344 rat substrain. *Clin Exp Immunol.* 2009;158:133-42.
56. Du T, Sapienza S, Eidelman DH, Wang NS, and Martin JG. Morphometry of the airways during late responses to antigen challenge in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:132-7.
57. Pae S, Cho JY, Dayan S, Miller M, Pemberton AD, Broide DH. Chronic allergen challenge induces bronchial mast cell accumulation in BALB/c but not C57BL/6 mice and is independent of IL-9. *Immunogenetics.* 2010;62:499-506.
58. Du T, Xu LJ, Lei M, Wang NS, Eidelman DH, Ghezzi H, et al. Morphometric changes during the early airway response to allergen challenge in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:1037-41.
59. Hirota JA, Ellis R, Inman MD. Regional differences in the pattern of airway remodeling following chronic allergen exposure in mice. *Respir Res.* 2006;7:120.
60. Panettieri RA Jr., Murray RK, Eszterhas AJ, Bilgen G, Martin JG. Repeated allergen inhalations induce DNA synthesis in airway smooth muscle and epithelial cells in vivo. *Am J Physiol.* 1998;274:L417-24.
61. Ramos-Barbón D, Presley JF, Hamid QA, Fixman ED, Martin JG. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest.* 2005;115:1580-9.
62. Fraga-Iriso R, Nunez-Naveira L, Brienza NS, Centeno-Cortes A, Lopez-Pelaez E, Verea H, et al. Development of a murine model of airway inflammation and remodeling in experimental asthma. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:422-8.
63. Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:382-8.