

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**



**DETERMINACIÓN DEL EFECTO PNEUMOPROTECTOR DEL  
RESVERATROL EN UN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR  
IDIOPÁTICA INDUCIDO POR BLEOMICINA EN RATAS WISTAR”  
AREQUIPA-2018**

Tesis presentada por los Bachilleres:

**Cáceres Díaz, Karelyn.**

**Caluchi Carrillo, Elvis Luis.**

para optar el Título Profesional de

**Químico Farmacéutico.**

Asesora:

**Dra. Guillen Núñez, María Elena**

**AREQUIPA - PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000017240  
N° Trámite en Fac. 1744-2018  
Fecha 05-04-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CACERES DIAZ, Karelyn  
CALUCHI CARRILLO, Elvis Luis

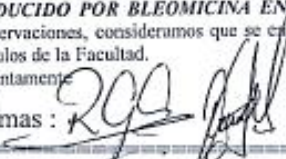
TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EFECTO PNEUMOPROTECTOR DEL RESVERATROL Y OMEGA 3 EN UN MODELO DE  
FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA POR BLEOMICINA EN RATAS WISTAR"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar 2) Dra. Karin Vera López

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos revisado el Plan de Tesis intitulado: "DETERMINACION DEL EFECTO PNEUMOPROTECTOR DEL RESVERATROL EN UN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA INDUCIDO POR BLEOMICINA EN RATAS WISTAR. AREQUIPA 2018" informando que: formuladas y corregidas las observaciones, consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite estipulado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 03/05/18

ASESOR: Mgter. Maria Elena Guillen Núñez

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesora en el presente Trabajo de Investigación, cumpla con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma  Fecha 23/05/18


DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 3) Dra. Karin Vera López  
2) Dra. Gutiérrez Aranibar

DICTAMEN DE BORRADOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 21/05/18

JURADOS: Presidente DRA. GABY VELASCO LOZANO,  
Vocal DRA. ROXANA GUTIERREZ ARANIBAR  
Secretario DRA. KARIN VERA LOPEZ

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 7/04/18 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)

  
DECANO

## DEDICATORIA

Ante todo, Dios, quién siempre me guía por el buen camino y porque cada día es una bendición que él me da para estar con mis seres queridos.

Le dedico con todo mi cariño a mi padre Luis, quien todo su sacrificio me ha formado y educado y siempre me apoya incondicionalmente.

De manera muy especial, a mi madre Rosa, quien día a día nos demuestra que el amor de una madre no tiene comparación, a mi hermana y a mi primo Hugo, quien es más que un hermano en mi vida y Pamela, quien siempre está en todo momento a mi lado apoyándome. Los quiero con todo mi corazón.

Finalmente a mi abuelito Vidal Carrillo, a quien nunca olvidaré y siempre estará presente en nuestros corazones, guiándonos desde el cielo.

*Elvis.*

## DEDICATORIA

Al forjador de mi camino, mi padre celestial, quien me acompaña día a día y siempre me levanta de los tropiezos. Gracias por las bendiciones diarias que me otorgas Dios.

Dedico esta tesis con mucho cariño y de manera muy especial a mi familia.

A mi padre Edwin Huber, por ser mi modelo de responsabilidad y disciplina diaria. Gracias por la confianza que depositaste en mí, y por la educación que me has brindado hasta ahora.

A mi Madre Luz Marina, por estar conmigo en todo momento, respaldar mis sueños y creer en mis talentos. Gracias por cuidarme, educarme y haber sacrificado con mucho coraje y constancia la mayor parte de tu vida por nosotros.

A mis hermanos Daniel, Jesús y María Fernanda por ser mis amigos “Cukis”. Gracias por compartir momentos importantes y especiales en mi vida.

A mi mamita Francisca y mi tío Wilber por guiarme con paciencia y estar presentes durante mi desarrollo personal y profesional.

A Sammy por ser la más fiel compañera y amiga en el desarrollo de este trabajo, un perro entre mil.

*Karelyn.*

## AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirnos culminar uno de nuestros objetivos.

A la Universidad Católica de Santa María, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y docentes por brindarnos educación y calidad humana.

A nuestra asesora, María Elena Guillen, por su orientación brindada en la redacción e inicio de nuestra investigación.

De manera muy especial agradecer a la Dra. Eloisa Zuñiga, directora de la clínica veterinaria de la Universidad Católica de Santa María, por su apoyo, dedicación y tiempo otorgado en momentos cruciales del presente proyecto.

De igual manera, agradecemos al Dr. Jaime Cárdenas García, director del Laboratorio de Control de Calidad y al Dr. Ricardo Abril, por su colaboración y apoyo integral en la realización de este proyecto.

Así mismo, a la Dra. Julitza Paredes Fuentes y a la Dra. Karín Vera Lopez por apoyarnos gentilmente en el desarrollo de nuestra investigación.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMEN .....	XVIII
ABSTRACT .....	XX
INTRODUCCIÓN.....	XXII
HIPÓTESIS .....	XXIII
OBJETIVOS.....	XXIV
CAPÍTULO I.....	25
MARCO TEÓRICO .....	25
1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA .....	26
1.1. DEFINICIÓN .....	26
1.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	27
1.2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA:.....	27
1.3. PATOGÉNESIS DE LA IPF .....	28
1.3.1. INMUNIDAD INNATA Y ROL DE LA INFLAMACIÓN EN LA IPF.....	28
1.3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	29
1.3.3. MIGRACIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS.....	30
1.3.4. DIFERENCIACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS EN MIOFIBROBLASTOS.....	30
1.3.5. AUSENCIA DE CELULAS EPITELIALES ALVEOLARES TIPO I.....	31
1.3.6. RELACIÓN ENTRE IPF Y EL ENVEJECIMIENTO.....	31
1.3.7. ESTADIO DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS.....	32
1.3.8. REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR .....	32
1.4. FACTORES DE RIESGO.....	33
1.4.1. EDAD.....	33
1.4.2. FACTORES GENÉTICOS .....	33
1.4.3. FACTORES AMBIENTALES .....	34
1.4.4. FACTORES OCUPACIONALES .....	34
1.4.5. FACTOR DE RIESGO ASOCIADO AL REFLUJO GASTRO ESOFÁGICO .....	34
1.5. CLÍNICA DE LA IPF .....	35
1.6. EVOLUCIÓN NATURAL DE LA ENFERMEDAD .....	35
1.7. COMPLICACIONES.....	36

1.8. PRONÓSTICO.....	36
1.9. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA IPF .....	37
1.9.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	37
1.9.2. ESPECIES REACTIVAS DE NITROGENO.....	37
1.9.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	37
1.9.3.1. MALONDEHALDEHÍDO.....	38
1.9.3.1.1. ENSAYO DE TBARS .....	38
1.10. DIAGNÓSTICO .....	39
1.10.1. RADIOGRAFIA DE TORAX .....	39
1.10.2. PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR .....	40
1.10.3. ESPIROMETRÍA FORZADA.....	40
1.10.4. PRUEBAS DE CAPACIDAD DE DIFUSIÓN .....	40
1.10.5. PRUEBA DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	40
1.10.6. BIOPSIA PULMONAR.....	41
1.11. TRATAMIENTO .....	42
1.11.1. MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON IPF.....	42
1.11.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....	43
1.11.2.1. N-ACETILCISTEÍNA.....	43
1.11.3. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO .....	43
1.11.3.1. TRASPLANTE PULMONAR .....	43
1.11.3.2. OXIGENOTERAPIA DOMICILIARIA.....	44
1.11.3.3. REHABILITACIÓN PULMONAR .....	44
1.11.4. NUEVAS TERAPIAS.....	44
1.11.4.1. TERAPIA CELULAR.....	45
1.11.5. PERSPECTIVA EN EL TRATAMIENTO.....	45
2. LA BLEOMICINA.....	45
2.1. ESTRUCTURA.....	46
2.2. FARMACOCINÉTICA .....	46
2.3. MECANISMO DE ACCIÓN.....	46
2.3.1. HIDROLASA DE BLEOMICINA .....	47
2.4. TOXICIDAD PULMONAR .....	47
2.4.1. DAÑO EPITELIAL PULMONAR INDUCIDO POR BLM.....	47
2.4.2. MECANISMO DE LESIÓN PULMONAR POR BLM EN LA IPF.....	47
3. RESVERATROL.....	48

3.1. ESTRUCTURA.....	48
3.2. FARMACOCINÉTICA DEL RSV .....	48
3.3. MECANISMO DE ACCIÓN .....	49
3.3.1. EFECTO ANTIOXIDANTE.....	49
3.3.2. EFECTOS ANTINFLAMATORIO .....	49
3.3.3. EFECTOS SOBRE LIPOPROTEÍNAS .....	49
4. MODELOS ANIMALES .....	49
4.1. MODELO ANIMAL DE IPF.....	50
4.1.1. EL MODELO MURINO DE BLM.....	50
4.1.1.1. VÍA DE ADMINISTRACION DE BLM EN LA INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR: .....	51
4.1.1.1.1. DOSIS DE BLM EN EL MODELO DE IPF .....	52
4.1.1.1.2. INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL DE BLM EN LA INDUCCIÓN DE IPF .....	52
4.1.2. OTROS MODELOS DE IPF .....	54
4.1.2.1. ASBESTOSIS .....	54
4.1.2.2. SÍLICE.....	54
4.1.2.3. ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA.....	54
4.1.2.4. MODELO DE FIBROSIS PULMONAR RELACIONADO A LA EDAD .....	55
CAPÍTULO II.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN .....	58
1.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	58
1.2. TIPO DE ESTUDIO .....	58
1.3. UNIDADES DE ESTUDIO .....	58
1.4. ORGANIZACIÓN DE LAS UNIDADES DE ESTUDIO .....	59
1.5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	60
1.5.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	60
1.5.2. MATERIAL DE LABORATORIO .....	60
1.5.2.1. EQUIPOS .....	60
1.5.2.2. REACTIVOS.....	61
1.5.2.3. MATERIAL.....	62
1.5.2.4. MATERIAL ANEXO.....	62
1.5.2.5. FÁRMACOS Y/O TRATAMIENTO .....	62



2. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	62
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN.....	62
2.2. OBTENCIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO .....	63
2.2.1. EXTRACCIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO.....	64
2.2.2. OBTENCIÓN DEL VIAL DE BLM .....	64
2.3. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECONSTITUCIÓN DE BLM .....	65
2.3.1. EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP).....	65
2.3.1.1. DISTRIBUCIÓN Y RECONOCIMIENTO DEL ÁREA DE MEZCLAS ONCOLÓGICAS .....	65
2.3.1.2. CÁLCULO PARA EL AJUSTE DE DOSIS DEL VIAL DE BLM .....	66
2.3.1.3. RECONSTITUCIÓN DEL VIAL DE BLM .....	67
3. TÉCNICAS Y MÉTODOS .....	68
3.1. PROCEDIMIENTOS PARA LA INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR .....	68
3.2. PROCEDIMIENTO DE ANESTESIA .....	69
3.3. INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL DE BLM.....	70
3.4. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO CON RSV A LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	71
3.5. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE EXPERIMENTACIÓN .....	72
4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO SANGUÍNEO POR EL MÉTODO DE TBARS .....	72
4.1. FUNDAMENTO.....	72
4.2. PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO TBARS .....	73
4.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES Y CURVA DE CALIBRACIÓN.....	73
5. BIOPSIA PULMONAR .....	74
5.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PULMONARES .....	75
6. TINCIONES HISTOLÓGICAS .....	76
6.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E) .....	76
6.2. TINCIÓN TRICÓMICO DE MASSON .....	77
6.2.1. EL FIJADOR ESPECIAL DE BOUIN.....	77
6.2.1.1. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	78
7. ANÁLISIS DE DATOS .....	79
CAPÍTULO III .....	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	80
1. INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.....	81
2. EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LOS PESOS CORPORALES DE LAS RATAS DURANTE 14 DÍAS DE POST-INDUCCIÓN DE IPF – GRUPO A .....	82

3. EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LOS PESOS CORPORALES DE LAS RATAS DURANTE 30 DÍAS DE POST-INDUCCIÓN DE IPF – GRUPO B .....	83
4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO EN SUERO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN POR EL MÉTODO DE TBARS.....	84
4.1. GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL ENSAYO DE TBARS PARA LA DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA).....	84
4.2. EVALUACIÓN DE LOS VALORES BASALES DE MDA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTACIÓN A Y B .....	85
4.3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: DÍAS BASALES Y DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) PERTENECIENTES AL GRUPO A .....	87
4.3.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO TRATAMIENTO CON RSV:.....	87
4.3.2. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO CONTROL POSITIVO CON BLM: .....	89
4.3.3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO BLANCO: .....	91
4.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: DÍAS BASALES Y DIAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30) PERTENECIENTES AL GRUPO B .....	93
4.4.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO TRATAMIENTO CON RSV:.....	93
4.4.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO CONTROL POSITIVO CON BLM: .....	95
4.4.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUB GRUPO BLANCO .....	97
4.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: MUESTRAS BASALES, DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) Y SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO A .....	99
4.6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: MUESTRAS BASALES, DÍAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30) Y SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO B .....	101
5. BIOPSIAS PULMONARES .....	104
5.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICOS DE PULMONES DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B .....	104
5.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DE CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO PULMONAR DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN .....	106
5.2.1. ANÁLISIS DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN POR EL MÉTODO DE ASHCROFT EN LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B – TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA .....	106
5.2.2. ANÁLISIS DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN POR EL MÉTODO DE ASHCROFT EN LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B .....	109

– TINCIÓN TRICOMICO DE MASSON .....	109
CAPÍTULO IV .....	114
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS .....	114
CONCLUSIONES .....	115
REFERENCIAS .....	117
ANEXOS .....	126



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la unidad alveolo capilar.....	27
<b>Figura 2.</b> Focos fibroblásticos .....	31
<b>Figura 3.</b> Frecuencias estimadas de mutaciones genéticas que predisponen a la IPF. ....	33
<b>Figura 4.</b> Fenotipos clínicos de la IPF. ....	35
<b>Figura 5.</b> Esquema de reacción entre el MDA y TBA. ....	39
<b>Figura 6.</b> Radiografía de Tórax de un paciente normal frente a un paciente con IPF. ....	39
<b>Figura 7.</b> Patrón característica de IPF por TCAR.....	41
<b>Figura 8.</b> Patrón histológico típico de UIP. ....	42
<b>Figura 9.</b> Estructura química de Bleomicina. ....	46
<b>Figura 10.</b> Activación de BLM por el Hierro y Oxígeno. ....	48
<b>Figura 11.</b> Estructura química del trans-resveratrol el cis-resveratrol .....	48
<b>Figura 12.</b> Secuencia de eventos en la IPF inducido por BLM. ....	51
<b>Figura 13.</b> Control del peso de los animales de experimentación. ....	58
<b>Figura 14.</b> Línea de Tiempo del Proyecto Experimental.....	60
<b>Figura 15.</b> Espectrofotómetro (Varioskan LUX).....	61
<b>Figura 16.</b> Obtención de la muestra.....	64
<b>Figura 17.</b> Recolección de las muestras. ....	64
<b>Figura 18.</b> Obtención de Suero sanguíneo.....	64
<b>Figura 19.</b> Vial de BLM. ....	65
<b>Figura 20.</b> Áreas de la Unidad de mezclas Oncológicas. ....	66
<b>Figura 21.</b> Reconstitución del Vial de Bleomicina.....	68
<b>Figura 22.</b> Traslado de los grupos de animales de experimentación a la Clínica veterinaria de UCSM. ....	69
<b>Figura 23.</b> Anestesia de los grupos de experimentación. ....	69
<b>Figura 24.</b> Cámara de oxigenación (Midwark VMS).....	70
<b>Figura 25.</b> Instilación Intratraqueal. ....	71
<b>Figura 26.</b> Administración de Resveratrol como tratamiento. ....	72
<b>Figura 27.</b> Procedimiento en la formación del complejo MDA-TBA.....	73
<b>Figura 28.</b> Eutanasia de los grupos de estudio. ....	74
<b>Figura 29.</b> Procesamiento de las muestras pulmonares. ....	76
<b>Figura 30.</b> Evolución de pesos durante 14 post-inducción de IPF. ....	82
<b>Figura 31.</b> Evolución de pesos durante 30 días de post-inducción de IPF. ....	84
<b>Figura 32.</b> Gráfica de calibración de MDA.....	85
<b>Figura 33.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento. ....	88
<b>Figura 34.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo control positivo. ....	90
<b>Figura 35.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo blanco.....	93
<b>Figura 36.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo resveratrol. ....	95
<b>Figura 37.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo bleomicina. ....	97
<b>Figura 38.</b> Comparación de los niveles de MDA del subgrupo blanco.....	99
<b>Figura 39.</b> Comparación de los niveles de MDA del grupo A. ....	101
<b>Figura 40.</b> Comparación de los niveles de MDA del grupo B. ....	103

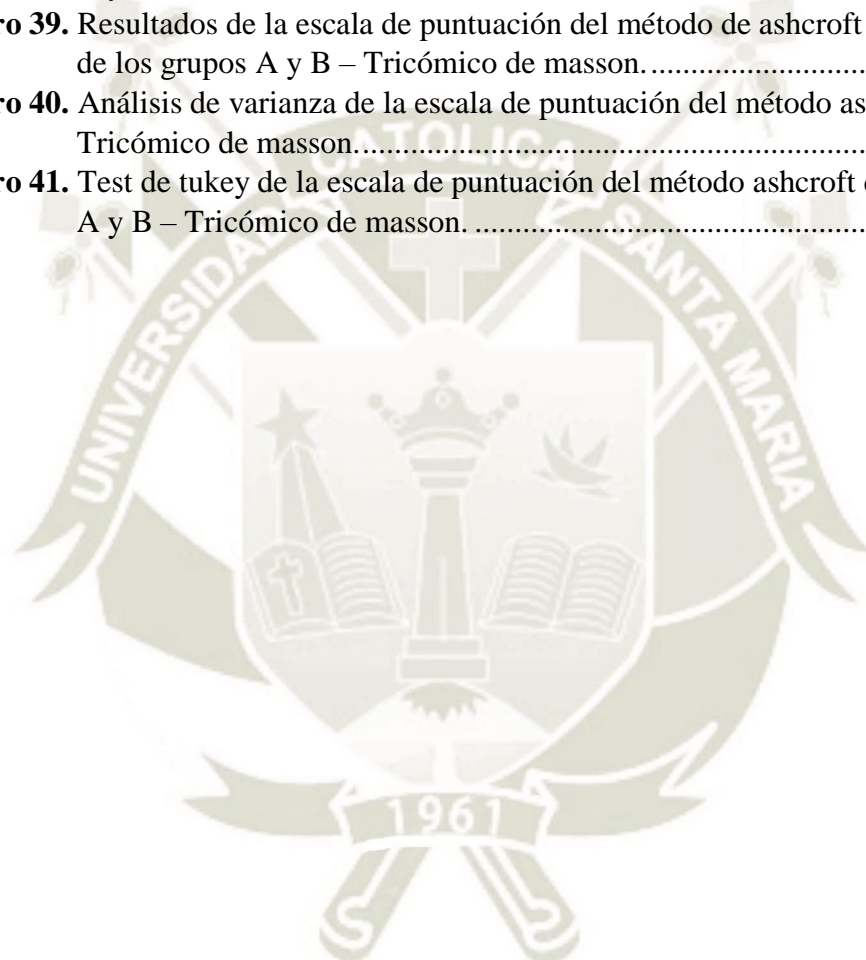
<b>Figura 41.</b> Biopsias pulmonares representativas pertenecientes a los grupos experimentales A (día 14) y B (día 30). .....	105
<b>Figura 42.</b> Tinciones histológicas representativas de H&E pertenecientes a los grupos A (día 14) y B (día 30) .....	106
<b>Figura 43.</b> Comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B - Tinción hematoxilina y eosina. ....	108
<b>Figura 44.</b> Tinciones histológicas representativas de tricrómico de masson pertenecientes a los grupos A (día 14) y B (día 30). ....	110
<b>Figura 45.</b> Comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B - tinción tricrómico de masson. ....	110



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características histológicas en biopsia de pacientes con IPF.....	41
<b>Cuadro 2.</b> Vías de administración de BLM.....	53
<b>Cuadro 3.</b> Mecanismos patogénicos en modelos animales de IPF.....	55
<b>Cuadro 4.</b> Ventajas y desventajas de modelos animales para el estudio de fibrosis pulmonar.....	56
<b>Cuadro 5.</b> División de los grupos de estudio.....	59
<b>Cuadro 6.</b> Identificación de los Animales de experimentación.....	63
<b>Cuadro 7.</b> Volúmenes de dosis ajustadas al peso de los animales de experimentación.....	67
<b>Cuadro 8.</b> Promedio de pesos del grupo A.....	82
<b>Cuadro 9.</b> Promedio de pesos del grupo B.....	83
<b>Cuadro 10.</b> Preparación de los patrones de MDA.....	84
<b>Cuadro 11.</b> Valores de MDA basales en suero del grupo <b>A</b> ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	86
<b>Cuadro 12.</b> Valores de MDA basales en suero del grupo <b>B</b> ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	86
<b>Cuadro 13.</b> ANOVA de 1 vía de los valores basales en suero de MDA de los grupos A Y B.....	86
<b>Cuadro 14.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	87
<b>Cuadro 15.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento.....	88
<b>Cuadro 16.</b> Test de tukey del subgrupo tratamiento.....	89
<b>Cuadro 17.</b> Niveles de MDA del subgrupo control positivo ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	89
<b>Cuadro 18.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo control positivo.....	90
<b>Cuadro 19.</b> Test de tukey del subgrupo control positivo.....	91
<b>Cuadro 20.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo blanco ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	92
<b>Cuadro 21.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo blanco.....	92
<b>Cuadro 22.</b> Test de tukey del subgrupo blanco.....	93
<b>Cuadro 23.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	94
<b>Cuadro 24.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento.....	94
<b>Cuadro 25.</b> Test de tukey del subgrupo tratamiento.....	95
<b>Cuadro 26.</b> Niveles de MDA del subgrupo control positivo ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	96
<b>Cuadro 27.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo control positivo.....	96
<b>Cuadro 28.</b> Test de tukey del subgrupo control positivo.....	97
<b>Cuadro 29.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo blanco ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	98
<b>Cuadro 30.</b> ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo blanco.....	98
<b>Cuadro 31.</b> Test de tukey del subgrupo blanco.....	99
<b>Cuadro 32.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA pertenecientes al grupo A. ( $\mu\text{mol/L}$ ).....	100

<b>Cuadro 33.</b> ANOVA de 2 vías de los niveles de MDA del grupo A. ....	100
<b>Cuadro 34.</b> Cuadro resumen de los niveles de MDA pertenecientes al grupo B ( $\mu\text{mol/L}$ ). ....	102
<b>Cuadro 35.</b> ANOVA de 2 vías de los niveles de MDA del grupo B.....	102
<b>Cuadro 36.</b> Resultados de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B – H&E. ....	107
<b>Cuadro 37.</b> Análisis de varianza de la escala de puntuación del método de ashcroft – H&E.....	108
<b>Cuadro 38.</b> Test de tukey de la escala de puntuación del método ashcroft de los grupos A y B – H&E. ....	108
<b>Cuadro 39.</b> Resultados de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B – Tricómico de masson. ....	110
<b>Cuadro 40.</b> Análisis de varianza de la escala de puntuación del método ashcroft – Tricómico de masson.....	111
<b>Cuadro 41.</b> Test de tukey de la escala de puntuación del método ashcroft de los grupos A y B – Tricómico de masson. ....	111



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AEC:	Células epiteliales alveolares
AEC-I:	Células epiteliales alveolares tipo I
AEC-II:	Células epiteliales alveolares tipo II
$\alpha$ -SMA:	Alfa actina del musculo liso.
BP:	Biopsia pulmonar.
CCL-18:	Quimioquina 18
CPA:	Células presentadoras de antígeno
DLCO:	Capacidad de difusión del monóxido de carbono
DPLD:	Enfermedades pulmonares parénquima difusas
ECM:	Matriz extracelular
EPP:	Equipo de protección personal.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FP:	Fibrosis pulmonar
FVC:	Capacidad vital forzada
GERD:	Enfermedad por reflujo gastroesofágico.
GERD:	Enfisema pulmonar
GSH:	Glutación reducido
HTP:	Hipertensión pulmonar
Ig:	Inmunoglobulina
IIP:	Neumonía intersticial idiopática
IL-8:	Interleuquina 8
IM:	Intramuscular.
IPF:	Fibrosis pulmonar idiopática
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad.
LP:	Peroxidación lipídica
MDA:	Malondialdehído.
MMP-7:	Metaloproteasa de matriz 7
NAC:	N-acetilcisteína.
NF-kB:	Factor nuclear kappa B.



NK:	Natural killers
NO:	Óxido nítrico
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PFTs:	Pruebas de función pulmonar.
PM6M:	Prueba de marcha de los 6 minutos
PUFAs:	Ácidos grasos poliinsaturados.
R3C:	Radical de carbono
RCOO:	Radical peroxilo
RL:	Radicales libres
RNS:	Especies reactivas de Nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de Oxígeno.
RSV:	Resveratrol
SITCP:	Sociedad internacional de trasplante de corazón y pulmón.
SOD:	Super óxido dismutasa.
SpO2:	Saturación de oxígeno percutáneo.
TBA:	Ácido tiobarbitúrico.
TBARS:	Sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico.
TCAR:	Tomografía computarizada de alta resolución.
TEP:	Tetraetoxipropano
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante beta.
TNF-a:	Factor de necrosis tubular alfa.
TP:	Trasplante pulmonar.
UIP:	Neumonía intersticial usual
UMO:	Unidad de mezclas oncológicas
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular.

## RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una de las enfermedades más letales, crónica e irreversible y de origen desconocido. La mortalidad debido a la IPF ha ido aumentando en las últimas décadas a tasas de 61.2 muertes por cada 1 000 000 personas. Generalmente su pronóstico es malo y la ineficacia a las terapias tradicionales conducen lentamente a la muerte. Hasta la actualidad se han estado desarrollando modelos animales para poder comprender un poco más esta enfermedad.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto pneumoprotector del resveratrol en un modelo de fibrosis pulmonar idiopática inducido por bleomicina en ratas *wistar*, teniendo como objetivos específicos: la reproducción del modelo murino de IPF experimental, cuantificación espectrofotométricamente del MDA, como un indicador de estrés oxidativo, en suero sanguíneo y la realización de 2 tinciones histológicas de pulmones, para la comparación de patrones histológicos característicos de la enfermedad.

El diseño experimental fue el siguiente: se organizaron dos grupos (con 3 subgrupos respectivamente), grupo "A" (por un intervalo de 14 días) y grupo "B" (por un intervalo de 30 días); de 12 ratas machos de raza *wistar*, cada una. Se extrajeron muestras sanguíneas, para la obtención de suero, durante 4 intervalos de tiempo diferentes para cuantificar el MDA. Finalmente, se sacrificaron los animales de

experimentación para la toma de biopsias pulmonares y realizar las respectivas tinciones histológicas, tras 14 y 30 días de experimentación.

Por último, se obtuvo los siguientes resultados: Los subgrupos a los cuales se les instiló intratraquealmente BLM y recibieron como tratamiento RSV, expresaron menores concentraciones de MDA en suero,  $1.878 \pm 0.024 \mu\text{mol/L}$  y  $2.361 \pm 0.082 \mu\text{mol/L}$ , grupo A y B, respectivamente, en contraste con los que solamente recibieron BLM,  $2.214 \pm 0.095 \mu\text{mol/L}$  y  $3.103 \pm 0.180 \mu\text{mol/L}$ , grupo A y B, respectivamente. De igual manera, los puntajes en los cortes histológicos, por el método Ashcroft, revelaron pneumoprotección por parte del RSV en la arquitectura pulmonar durante el curso de la enfermedad pulmonar fibrótica,  $3.69 \pm 0.34$ , en contraste con el control positivo con BLM,  $6.45 \pm 0.30$ , tinción H&E.

De esta manera se concluyó que, la administración de RSV proporciona efecto pneumoprotector en dos etapas del modelo animal, frente al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática inducido por BLM.

**Palabras Clave:** *Fibrosis pulmonar idiopática, bleomicina, resveratrol, malondialdehído, modelo murino.*

## ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is one of the most lethal, chronic and irreversible diseases of unknown origin. Mortality due to IPF has been increasing in recent decades at rates of 61.2 deaths per 1 000 000 people. Generally, their prognosis is bad and the ineffectiveness to traditional therapies leads slowly to death. Up to now, animal models have been developed to understand this disease a little more.

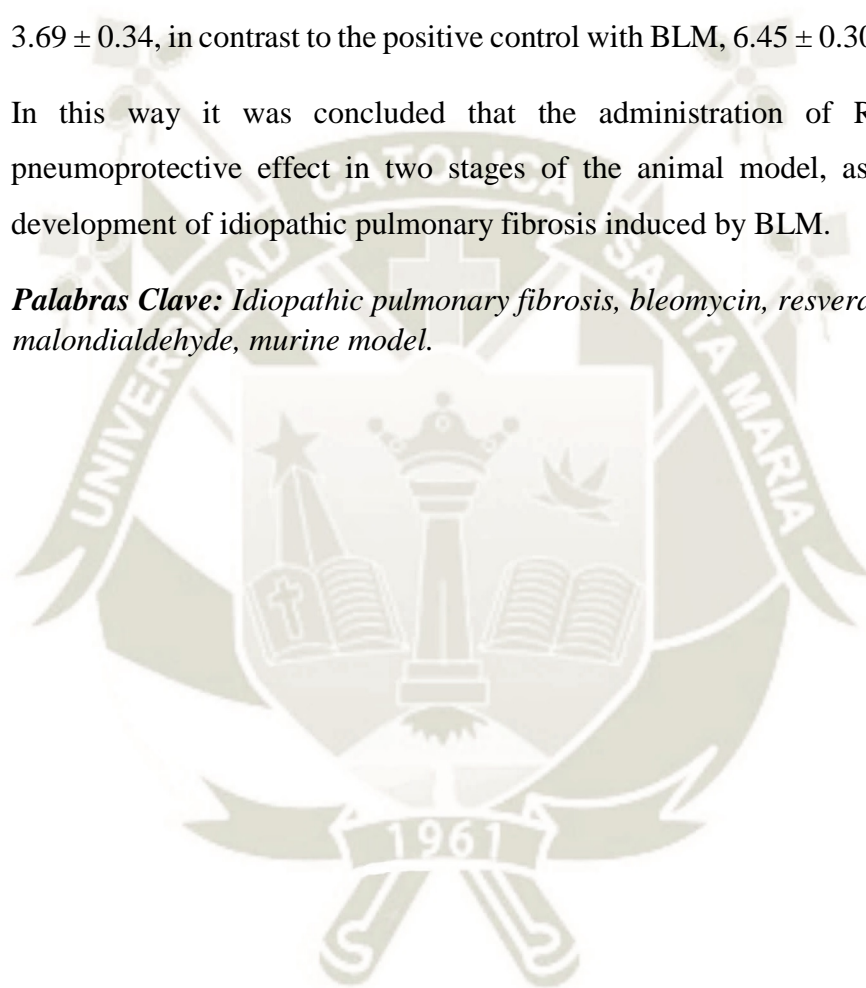
The main objective of this research was to determine the pneumoprotective effect of resveratrol in an idiopathic pulmonary fibrosis model induced by bleomycin in Wistar rats, having as specific objectives: the reproduction of the murine model of experimental IPF, quantification spectrophotometrically of MDA, as an indicator of oxidative stress, in blood serum and the performance of 2 histological lung stains, to compare histological patterns characteristic of the disease.

The experimental design was as follows: two groups were organized (with 3 subgroups respectively), group "A" (for an interval of 14 days) and group "B" (for an interval of 30 days); of 12 Wistar male rats, each one. Blood samples were collected, for obtaining serum, during 4 different time intervals to quantify the MDA. Finally, the experimental animals were sacrificed for the taking of lung biopsies and performing the respective histological stains, after 14 and 30 days of experimentation.

Finally, the following results were obtained: The subgroups to which BLM was intratracheally instilled and received as RSV treatment, expressed lower serum MDA concentrations,  $1,878 \pm 0.024 \mu\text{mol} / \text{L}$  and  $2,361 \pm 0.082 \mu\text{mol} / \text{L}$ , group A and B, respectively, in contrast to those that only received BLM,  $2,214 \pm 0.095 \mu\text{mol} / \text{L}$  and  $3,103 \pm 0.180 \mu\text{mol} / \text{L}$ , group A and B, respectively. Likewise, the scores in the histological sections, by the Ashcroft method, revealed pneumoprotection by the RSV in the pulmonary architecture during the course of fibrotic pulmonary disease,  $3.69 \pm 0.34$ , in contrast to the positive control with BLM,  $6.45 \pm 0.30$ , H & E staining.

In this way it was concluded that the administration of RSV provides a pneumoprotective effect in two stages of the animal model, as opposed to the development of idiopathic pulmonary fibrosis induced by BLM.

**Palabras Clave:** *Idiopathic pulmonary fibrosis, bleomycin, resveratrol, malondialdehyde, murine model.*



## INTRODUCCIÓN

La fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF) es una enfermedad pulmonar intersticial, inflamatoria, crónica, progresiva e irreversible de etiología desconocida; su pronóstico es pobre y el resultado es peor que muchas enfermedades malignas.<sup>1</sup> Sus características son semejantes al patrón histopatológico de la neumonía intersticial habitual (UIP), donde se incluye la remodelación de la arquitectura pulmonar con focos fibroblásticos y “panal de abeja”. Además, se caracteriza por la presencia y acumulación de células inflamatorias en la superficie alveolar; que dañan por medio de oxidantes y distorsión tisular. Los síntomas de la IPF aparecen gradualmente, comenzando con tos y disnea, por lo que puede confundirse con otras patologías ocasionando un diagnóstico tardío.<sup>2</sup>

De acuerdo a investigaciones en el Reino Unido, la incidencia global de IPF se encontró entre 2.8 y 9.3 casos por 100,000 por año.<sup>3</sup> A diferencia de Perú, no cuenta con registros públicos de la incidencia o prevalencia de IPF. La mayoría de los pacientes susceptibles de presentarlo son adultos entre 50 y 70 años.<sup>4</sup> Las opciones de tratamiento para la fibrosis pulmonar son limitadas, por lo que el manejo clínico se centra en el tratamiento de sus complicaciones, y en algunos casos implica trasplante pulmonar. Actualmente nuevos medicamentos como la Pirfenidona y el Nintedanib, pueden ralentizar la disminución funcional y la progresión de la enfermedad de forma aceptable, por lo que el desarrollo de nuevas terapias y/o tratamientos está en constante investigación.

El presente trabajo de investigación, está enfocando en la reproducción de la IPF experimental inducido por BLM, en un modelo murino. La BLM, es un antineoplásico usado en carcinomas y linfomas, que al interactuar con el ADN, inicia cambios inflamatorios y fibroproliferativos,<sup>5</sup> además de disminuir ciertos antioxidantes endógenos, lo que agrava la lesión tisular mediada por oxidantes.<sup>6</sup> Por ello, se han realizado estudios sobre los efectos beneficiosos del resveratrol (RSV) en la IPF, que le atribuyen su actividad antioxidante y antiinflamatoria, debido a la presencia de sus grupos fenólicos.<sup>7</sup>

En nuestro estudio, investigamos el efecto pneumoprotector del RSV en el modelo animal inducida por BLM, en ratas *Wistar* durante un periodo de estudio de 14 y 30 días.



## HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias naturales del resveratrol, es probable que, tenga un rol pneumoprotector importante en el curso de la fibrosis pulmonar idiopática inducida por Bleomicina en un modelo animal experimental.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto pneumoprotector del resveratrol en un modelo de Fibrosis Pulmonar Idiopática inducido por Bleomicina en ratas *Wistar*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reproducir satisfactoriamente el modelo animal de fibrosis pulmonar idiopática.
2. Cuantificar los niveles de malondialdehído en suero sanguíneo, como un indicador de estrés oxidativo y contrastar su expresión frente al tratamiento con resveratrol.
3. Observar y comparar los efectos antiinflamatorios y antifibróticos del resveratrol en el tejido pulmonar de los animales de experimentación, por medio de tinciones histológicas.





# **CAPÍTULO I**

## **MARCO TEÓRICO**

## 1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

### 1.1. DEFINICIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad pulmonar alveolo-intersticial<sup>8</sup>, crónica, progresiva, irreversible y usualmente letal de etiología desconocida; es la forma más prevalente dentro de la categoría de neumonías intersticiales idiopáticas (IIP).<sup>1</sup> Se caracteriza por un patrón histopatológico de neumonía intersticial usual (UIP).<sup>9</sup> Uno de los aspectos más resaltantes es la inflamación pulmonar y clásicamente un depósito excesivo y desorganizado en la matriz extracelular (ECM) dentro del intersticio pulmonar<sup>10</sup> con posterior fibrosis.<sup>11</sup> La fibrosis es un trastorno por el cual el tejido conectivo fibroso prolifera y se disemina sobre las estructuras orgánicas normales reemplazándolas; dicha reacción es inespecífica y suele ser la consecuencia de un proceso inflamatorio más o menos importante<sup>12</sup>.

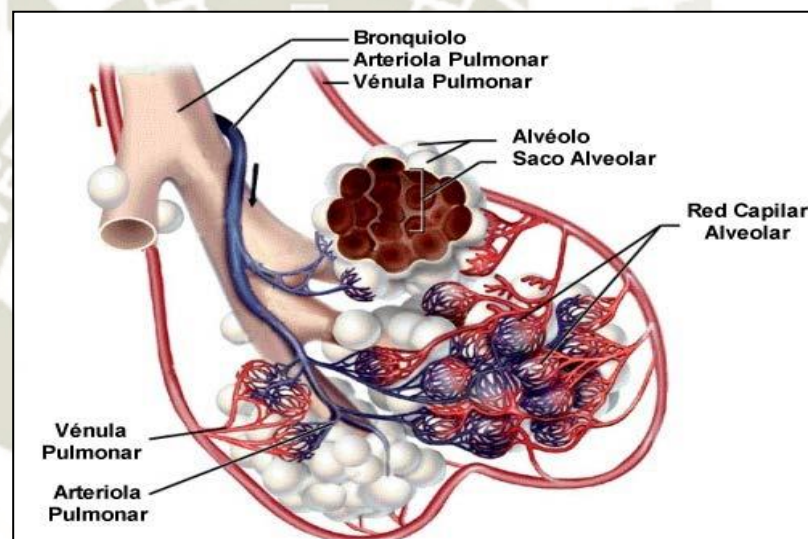
La IPF pertenece a una familia de aproximadamente 200 enfermedades relacionadas conocidas como enfermedades pulmonares parénquima difusas (DPLD).<sup>13</sup> Algunas de las DPLD tienen etiologías conocidas que incluyen factores ocupacionales (asbestosis, silicosis), trastornos sistémicos (esclerosis sistémica, artritis reumatoide) o son inducidos por fármacos (bleomicina). En contraste, la mayoría de los casos no tienen etiología conocida y se denominan IIP<sup>10</sup>.

Una barrera crítica para tratar esta enfermedad es la falta de comprensión de la fisiopatología que impulsa la fibrosis. En la fibrosis pulmonar (FP), la inflamación pulmonar normalmente autolimitada que produce la curación y la restauración de la integridad del tejido, se convierte en una inflamación constante caracterizada por la infiltración persistente de células inflamatorias<sup>11</sup>; algunos estudios muestran que existe una migración, proliferación y activación crónica de las células mesenquimales del epitelio alveolar de los pacientes, lo cual resulta en la formación de fibroblastos y focos de miofibroblastos<sup>14</sup> que compromete el intercambio de gases alveolares y por lo tanto a menudo conduce a la muerte prematura<sup>10</sup>. Estudios recientes han implicado una respuesta inmune desregulada<sup>11</sup>.

Aunque la etiología de esta inflamación persistente no está clara; está claro que esta enfermedad está asociada con la persistencia de citoquinas y quimioquinas

proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tubular alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), la interleuquina 8 (IL-8), entre otras,<sup>11</sup> ocasionando la pérdida del área de la superficie alveolar y conduciendo a un deterioro del intercambio gaseoso y la función pulmonar.<sup>15</sup> En la **Figura 1**, se muestra una ilustración de la estructura alveolo-capilar, en donde se produce los daños descritos.

Se cree que el desencadenante pueden ser estímulos exógenos en sujetos predispuestos genéticamente induciendo así, el daño descrito y su posterior fallo en la correcta reparación<sup>8</sup>. La magnitud y la susceptibilidad de la lesión parece estar relacionada con el envejecimiento.<sup>46</sup>



**Figura 1.** Estructura de la unidad alveolo capilar.<sup>12</sup>

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

### 1.2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA:

Hasta la actualidad no se conoce con certeza cuál es la prevalencia e incidencia real de la IPF. Al 2015, la incidencia global de IPF se encontró entre 2.8 y 9.3 casos por 100,000 por año de acuerdo con una revisión sistemática realizada por la división de epidemiología y salud pública en el Reino Unido. Perú no cuenta con registros públicos de la incidencia o prevalencia de IPF. Entre los países colindantes se tiene que, en Brasil la incidencia al 2010 fue de 0.48 por 100 000 habitantes. Estas cifras indican que se trata de una enfermedad rara y desconocida, aunque se ha encontrado

que tiene prevalencia con la edad más frecuente en hombres que en mujeres en una razón de 1.5 – 1. 7:1 .<sup>14</sup>

La incidencia anual de la IPF está aumentando y se estima entre 4,6 y 16,3 por cada 100 000 personas y una prevalencia de 13 a 20 casos por 100 000 personas.<sup>1</sup> Los grupos más susceptibles de presentar este padecimiento son adultos de edad media en adelante, aunque dos tercios de los pacientes diagnosticados se encuentran por encima de los 60 años.<sup>17</sup>

La mortalidad debido a la IPF ha aumentado en las últimas dos décadas a tasas de 61.2 muertes por cada 1,000,000 hombres y 54.5 muertes por cada 1,000,000 mujeres por año en los Estados Unidos.<sup>18</sup>

### **1.3. PATOGÉNESIS DE LA IPF**

En la actualidad se considera que el factor desencadenante del desarrollo de IPF es la lesión celular del epitelio alveolar, la razón exacta de esta lesión aún no se ha determinado. Sin embargo, se ha investigado que puede presentarse por la reparación anormal del epitelio alveolar, provocando la migración, proliferación y activación de las células mesenquimales y formando focos de fibroblastos y miofibroblastos, que estimula al posterior desarrollo de fibrosis. También se sabe que el proceso inflamatorio es secundario en el desarrollo de esta patología.<sup>19</sup>

#### **1.3.1. INMUNIDAD INNATA Y ROL DE LA INFLAMACIÓN EN LA IPF**

La inmunidad innata, es la primera línea de defensa que actúa contra cualquier agente nocivo, reconoce estructuras moleculares que tienen los microorganismos. En la inmunidad innata del sistema respiratorio participan barreras anatómicas, bioquímicas, fisiológicas y biológicas; también hay participación de mecanismos reflejos tusígenos y de estornudo.<sup>20</sup>

El sistema inmune innato, tiene función de mantener estériles las vías aéreas y lo realiza a través del factor humoral y celular. El factor humoral consta de moléculas (mucinas, péptidos antimicrobianos, lactoferrina, lisozima) que forman secreciones mucosas y están en la superficie epitelial de las vías aéreas, su actividad es bactericida, antiviral y detoxificante de moléculas

nocivas, así como la eliminación de patógenos por las propiedades físicas del moco y transporte mucociliar.<sup>21</sup>

Los factores celulares, están formados por grupos de diferentes células epiteliales, con capacidad fagocítica, que participan en la inflamación y presentación de antígeno. Las células epiteliales tienen como función la defensa externa de la vía aérea superior, las células fagocíticas comprenden: neutrófilos, monocitos, eosinófilos y macrófagos; las células con actividad citotóxica comprenden a las Natural Killer (NK).<sup>21</sup>

### 1.3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

Este sistema de defensas es específico, adquirido y se activa días después de que los antígenos logran evadir la respuesta inmune innata, el proceso provoca la activación de células y mecanismos altamente específicos contra el agente patógeno. Una de sus características es que posee memoria frente a los agentes nocivos.<sup>22</sup>

La inmunidad adaptativa también presenta factores humorales y celulares. Los factores humorales, son anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), encargados de neutralizar toxinas; en el sistema respiratorio las más resaltantes son **Ig A** e **Ig G**.<sup>21,22</sup>

**La Ig A** es liberada por las células epiteliales, se encuentra en altas concentraciones dentro de las secreciones bronquiales, mientras que **la Ig G** es la que predomina en el sistema respiratorio, por lo que presenta mayor actividad de opsonización en los alveolos.<sup>23</sup>

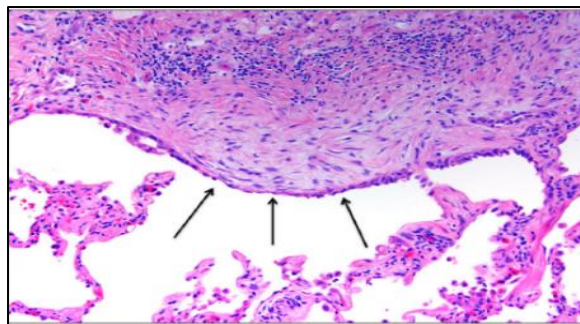
Los factores celulares tienen inmunidad específica, están compuestos por linfocitos T y B, ambos se ubican en el tejido linfático. Los linfocitos T no reconocen los antígenos libres y necesitan de las células presentadoras de antígeno (CPA), que tienen la función de protección contra bacterias intracelulares bronquiales y producción de anticuerpos. Los linfocitos B, a diferencia de los T, reconocen antígenos libres y no necesitan de presentación antigénica.<sup>23,24</sup>

### 1.3.3. MIGRACIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS

El daño que se produce en el epitelio alveolar y endotelio subyacente es fundamental en la fibrogénesis pulmonar y depende de la activación de células inflamatorias. El proceso inflamatorio se produce por la activación de leucocitos, esta mediada por citocinas que migran de la circulación sistémica (capilares sanguíneos) al parénquima pulmonar, produciendo una respuesta inflamatoria estimulada por mediadores inflamatorios como el TNF- $\alpha$ , formándose edemas alveolares, lesiones de neumocitos tipo II (AEC-II) y posteriormente a ello, se produce el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el sitio de la lesión.<sup>4,25</sup>

### 1.3.4. DIFERENCIACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS EN MIOFIBROBLASTOS

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en el tejido, constituyen un grupo heterogéneo de células, los cuales muestran fenotipos en ciertos estadios fisiológicos o fisio-patogénicos como miofibroblastos. Su función es sintetizar y mantener la matriz extracelular propia del tejido.<sup>26</sup> Los miofibroblastos son células semejantes a las del músculo liso por expresar alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en su cito esqueleto. Cuentan con diferentes funciones como cicatrización, por tener alta capacidad contráctil, reparación de la matriz extracelular, debido a que produce diversas moléculas como fibras colágenas elásticas y participan también, en la respuesta inmune al producir citosinas y quimioquinas estimulando o suprimiendo la respuesta inmune<sup>27</sup>. La diferencia entre estos tipos celulares se observa en tejidos dañados, en donde ambos se activan, mientras que los miofibroblastos como células contráctiles especializadas tienen mayor potencial profibrótico que los fibroblastos. En los focos fibroblásticos, (**Figura 2**) los miofibroblastos causan el depósito exagerado de matriz extracelular (fibrosis), que es el sello distintivo del proceso de cicatrización y conduce a la destrucción de la arquitectura pulmonar a través de la muerte celular.<sup>27</sup> Así, los miofibroblastos no solo son importantes agentes en la deposición de ECM sino que también, promueve la inflamación y contribuye al proceso de cicatrización aberrante de las heridas implicadas en la patogénesis de la IPF.<sup>10</sup>



**Figura 2.** Focos fibroblásticos.<sup>9</sup>

### 1.3.5. AUSENCIA DE CELULAS EPITELIALES ALVEOLARES TIPO I

Las células epiteliales alveolares (AEC) son la unidad respiratoria del pulmón, están formadas por sacos de aire pequeños de 200  $\mu\text{m}$ , gracias a sus paredes delgadas se produce el intercambio de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ . Estas paredes están compuestas por 2 tipos de células: células epiteliales alveolares tipo I (AEC-I) y células epiteliales alveolares tipo II (AEC-II).<sup>28</sup>

Las AEC-I recubren el 93% del epitelio alveolar y los del tipo II el 7%; estos últimos son más desarrollados, pueden sufrir mitosis y regenerar a los de tipo I. La función de las AEC-II es la síntesis, almacenamiento, y secreción del surfactante pulmonar el cual disminuye la tensión superficial para permitir el intercambio gaseoso y previniendo el colapso de los alvéolos. Los pacientes con IPF sufren una importante pérdida de AEC-I, la razón de esto es desconocida; aún no está claro si la disminución de células tipo I genera un desgaste en las membranas de los capilares alveolares y conduce a un desarrollo de fibrosis.<sup>29,30</sup>

### 1.3.6. RELACIÓN ENTRE IPF Y EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es considerado como factor de riesgo para el desarrollo de IPF. A pesar de que se desconocen mecanismos precisos, un posible mecanismo está relacionado con el acortamiento acelerado de los telómeros. La telomerasa es una polimerasa especializada responsable de la elongación telomérica, su alteración genera acortamiento o alargamiento en los telómeros que conduce a muerte celular.

Se cree que los telómeros cortos afectan la replicación de las células progenitoras que permanecen en los tejidos después de la lesión; por lo que las personas podrían correr riesgo de desarrollar IPF.<sup>31</sup>

El envejecimiento también se asocia al aumento de oxidantes en el epitelio pulmonar. Los leucocitos y células inflamatorias (neutrófilos, y macrófagos) se encargan de liberar gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando lesiones en el epitelio pulmonar y contribuyendo así al desarrollo de la IPF, en el cual existen un importante desbalance entre oxidantes/antioxidantes. El rol de los antioxidantes es de suma importancia para conservar la integridad celular, ya que desempeñan funciones tanto extracelulares como intracelulares.<sup>32</sup>

Una de las moléculas antioxidante predominantes; intra y extracelular es el glutatión (GSH); que tiene como funciones neutralizar las ROS, causadas por el estrés oxidativo en células y ADN. Los niveles bajos de este aceleran el envejecimiento.<sup>33</sup> Algunos de los antioxidantes endógenos son: Glutatión peroxidasa, súper-óxido-dismutasa, zinc, manganeso y exógenos como: vitamina E, C, flavonoides, beta-carotenos, etc.<sup>34</sup>

### **1.3.7. ESTADIO DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS**

La IPF se caracteriza por presentar proliferación de fibroblastos y acumulación anormal de la matriz extracelular (ECM).<sup>9</sup> Las células inflamatorias secretan citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que estimulan la activación de los fibroblastos, en curación de heridas en la IPF. En una cierta etapa los fibroblastos se activan y se convierten en miofibroblastos que son responsables de la síntesis y secreción de proteínas de la ECM.<sup>4</sup>

### **1.3.8. REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

La matriz extracelular (ECM) regula diferentes funciones celulares, como la proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión, metabolismo celular a través de la señalización de los receptores de adhesión celular.<sup>4</sup>

En la fibrosis, la remodelación tisular es la etapa final de la curación de heridas, en esta etapa los miofibroblastos promueven la contracción de la



herida, migrando hacia la zona de daño para regenerar el tejido. Este proceso de reparación contribuye con la formación de cicatrices, donde se presenta un desequilibrio entre la formación, degradación de la matriz y las proteínas de la ECM.<sup>4</sup>

## 1.4. FACTORES DE RIESGO

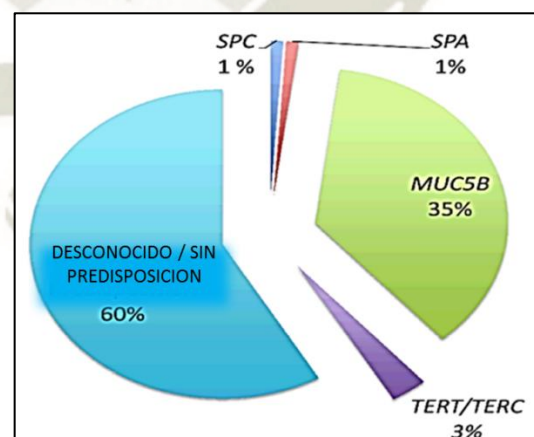
Aunque la IPF es una enfermedad de causa desconocida (idiopática), se identifican factores de riesgo asociados a esta, con muy poca evidencia y en muchos casos aún sigue siendo materia de investigación.

### 1.4.1. EDAD

La IPF es la patología que afecta en su gran mayoría a pacientes entre 50 y 70 años, ya que estos presentan un mayor deterioro progresivo de la función pulmonar.<sup>4</sup>

### 1.4.2. FACTORES GENÉTICOS

Ciertos factores genéticos pueden contribuir al riesgo de desarrollar IPF; alrededor del 5% de casos corresponden a este tipo, en el que dos o tres pacientes de la misma familia biológica pueden manifestar IPF. Las alteraciones genéticas que tienen mayor predisposición son las mutaciones en genes que mantienen la longitud en telómeros.<sup>35</sup> **(Figura 3)**



**Figura 3.** Frecuencias estimadas de mutaciones genéticas que predisponen a la IPF.<sup>9</sup>

#### **1.4.3. FACTORES AMBIENTALES**

El tabaquismo aumenta el riesgo de desarrollar IPF, no es un inductor de esta, pero si un agente que facilita respuestas profibróticas en el pulmón. Se desconoce el mecanismo en el que contribuya el desarrollo de IPF; sin embargo, se sabe que el humo de cigarro es una fuente de radicales libres y tóxicos entre los que se encuentran: aldehídos, epóxidos, peróxidos, óxidos de nitrógeno, radicales peroxilo ( $\text{RCOO}\bullet$ ), radicales de carbono ( $\text{R}_3\text{C}\bullet$ ) y de nitrógeno que incluyen principalmente al óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) que tiene una vida media resistente para alcanzar el espacio alveolar.<sup>36</sup>

#### **1.4.4. FACTORES OCUPACIONALES**

Las exposiciones ambientales al polvo de madera, ganado, polvo de metal y polvo de arena / piedra, son factores de riesgo significativos para el desarrollo de IPF. Si bien estas exposiciones ambientales pueden ocurrir tanto en hombres como en mujeres, pero es más probable que, los hombres mayores hayan desempeñado con mayor frecuencia puestos de trabajo asociados con este tipo de exposiciones.<sup>37</sup>

#### **1.4.5. FACTOR DE RIESGO ASOCIADO AL REFLUJO GASTROESOFÁGICO**

La enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD). Se define como el grupo de síntomas y daños que produjo el paso del contenido gástrico hacia el esófago, este puede continuar fluyendo y dañar la cavidad bucal, laringe u orofaringe. Los restos pueden ser ácidos, líquidos, gaseosos o semisólidos.<sup>35</sup>

El efecto de la GERD en IPF consiste en la micro aspiración (inhalación) de pequeñas cantidades de secreciones gástricas en laringe y pulmones, e induce a repetidos daños y lesiones en el parénquima pulmonar, así como interacción de fibroblastos epiteliales. Este fenómeno suele ser asintomático y en base a frecuencia e intensidad de la micro aspiración el paciente podrá presentar tos o sibilancia.<sup>38</sup>

## 1.5. CLÍNICA DE LA IPF

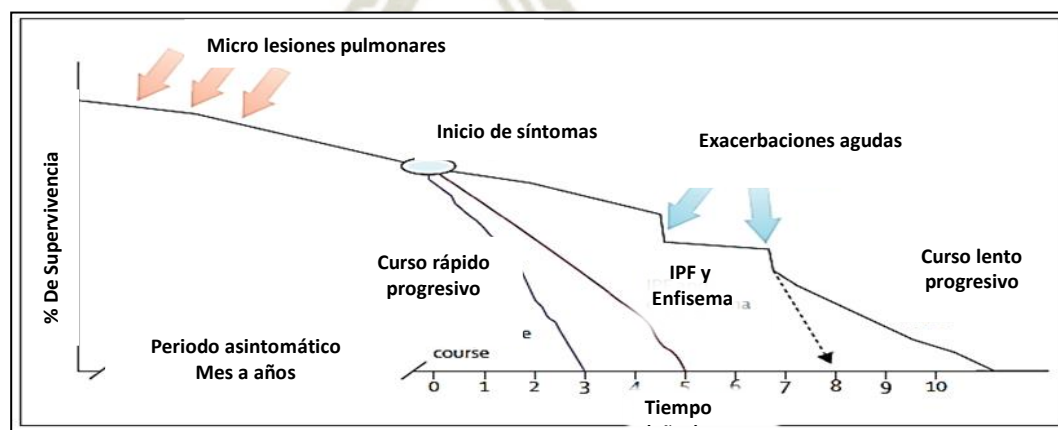
En la IPF es imprescindible llevar a cabo una anamnesis exhaustiva y una historia clínica detallada.<sup>12</sup>

Clínicamente, la IPF se caracteriza por un deterioro de la función pulmonar progresiva, evidenciándose en general por disnea de esfuerzo hasta llegar a una disnea en reposo, tos impulsiva crepitante en la auscultación en el 90% de los casos;<sup>1,8,13</sup> muchos pacientes se pueden encontrar asintomáticos y su enfermedad se detecta por alteraciones en radiografías de tórax, por lo que muchos de ellos no acuden al médico hasta meses después del comienzo de la enfermedad.<sup>39</sup>

En la fase avanzada es frecuente signos de hipertensión pulmonar (HTP) y finalmente signos de insuficiencia cardíaca derecha. También se va instaurando progresivamente un cuadro de hipoxemia y pruebas de función pulmonar restrictivas con una disminución de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), entre otras.<sup>13</sup>

## 1.6. EVOLUCIÓN NATURAL DE LA ENFERMEDAD

La evolución natural de la IPF es desconocida y la aparición de los síntomas es gradual caracterizándose como un trastorno pulmonar constante o lentamente progresivo;<sup>1,40</sup> la evolución de la enfermedad varía en cada caso, habiéndose identificado dos grandes grupos de pacientes: uno con una progresión lenta y sobrevida larga, y otro con progresión rápida y sobrevida corta.<sup>14</sup> La mortalidad durante la exacerbación aguda es alta.<sup>40</sup> **(Figura 4)**



**Figura 4.** Fenotipos clínicos de la IPF.<sup>1</sup>

## 1.7. COMPLICACIONES

Muchos pacientes con FPI experimentan episodios agudos de empeoramiento respiratorio que se asocian con un alto riesgo de muerte.<sup>5</sup> Entre las comorbilidades y complicaciones que pueden empeorar el curso clínico y el pronóstico de la IPF están: las exacerbaciones agudas, HTP, enfisema pulmonar, GERD, síndrome de apnea, carcinoma de pulmón, enfermedad coronaria, entre otras.<sup>13</sup>

## 1.8. PRONÓSTICO

Dentro de las IIP, la IPF ha recibido la mayor atención debido a su mal pronóstico único y su falta de respuesta a las terapias tradicionales y que lamentablemente hoy en día sabemos que conduce a la muerte en la mayoría de los casos.<sup>12,41</sup>

La IPF es una enfermedad de curso clínico variable, por lo que es importante identificar factores que puedan ayudar a definir el pronóstico de los pacientes. Diferentes estudios han evaluado factores clínicos, biomarcadores, parámetros radiológicos y fisiológicos y presencia de comorbilidades, asociados con mayor riesgo de mortalidad, tanto en el momento del diagnóstico como evolutivamente durante el seguimiento.<sup>42</sup>

Entre los factores pronósticos basales adversos en el momento del diagnóstico están: 1) Edad avanzada (> 70 años) y sexo masculino. 2) Grado de disnea basal y su incremento en el tiempo. 3) DLCO < 40% en el momento del diagnóstico, así como el descenso mayor al 10% de la capacidad vital forzada (FVC) y mayor al 15% de la DLCO en 6-12 meses. 4) Saturación de oxígeno percutánea  $SpO_2 \leq 88\%$  en la prueba de marcha de los 6 minutos (PM6M). 5) Extensión del patrón en “panal de abeja” en la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR). 6) Comorbilidades asociadas: HTP arterial, enfisema y carcinoma broncogénico. 7) Biomarcadores, aunque todavía no suficientemente validados para incorporarlos en el seguimiento de los pacientes, se ha descrito que niveles elevados en el suero de diferentes proteínas asociadas con la patogenia de la IPF pueden predecir mortalidad. Estas proteínas incluyen: marcadores de daño de células epiteliales alveolares, como la metaloproteasa de matriz 7 (MMP-7), de activación de macrófagos alveolares, como la quimioquina 18 (CCL-18) y de neutrófilos, como la interleuquina 8 (IL-8), entre otras.<sup>13,42</sup>

En general el pronóstico de los pacientes con FPI es malo, siendo la supervivencia media entre 3 y 5 años desde el inicio de los síntomas.<sup>14</sup>

## **1.9. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA IPF**

### **1.9.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas reactivas derivadas del oxígeno cuyo último orbital tiene un electrón no apareado que le da inestabilidad. Las ROS son neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante. El desequilibrio entre la producción y neutralización se define como estrés oxidativo, este puede darse por la producción excesiva de ROS conduciendo a un daño molecular y celular.<sup>43</sup>

Durante la respiración se inhalan diversos agentes xenobióticos suspendidos en el aire, que conducen a la liberación adicional de ROS contribuyendo al daño celular y participando en enfermedades pulmonares como el asma. La relación entre el desarrollo de IFP por la participación de ROS se debe a la acumulación de neutrófilos y macrófagos alveolares que generan daño celular del parénquima por lo que se modifica y destruye la arquitectura alveolar.<sup>44</sup>

### **1.9.2. ESPECIES REACTIVAS DE NITROGENO**

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son moléculas derivadas de nitrógeno que pueden atravesar las membranas celulares, ocasionar daño celular, peroxidar lípidos en las membranas celulares y dañar el ADN. También pueden oxidar al glutatión reducido (GSH) que es una molécula antioxidante muy importante en la célula y su depleción incrementa las ROS. Por todos estos procesos existe evidencia de que RNS tienen participación en el daño pulmonar.<sup>43</sup>

### **1.9.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

La peroxidación lipídica (LP) es el proceso oxidativo por el cual los radicales libres (RL) extraen electrones de las membranas lipídicas provocando su lesión e incremento en la producción de estos. Las cadenas de ácidos grasos presentan sensibilidad diferente frente a las ROS; los monoinsaturados son resistentes, mientras que los poliinsaturados son más sensibles y más propensos al daño peroxidativo.<sup>45</sup>

Las membranas celulares biológicas están llenas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) susceptibles a LP. Este proceso es irreparable y conduce a necrosis/apoptosis celular producto de la fragmentación de las cadenas de ácidos grasos o formación de enlaces lípido-proteína, lípido-lípido, que le generan alteración funcional, inactivación enzimática, y efectos tóxicos en la división celular.<sup>32,45</sup>

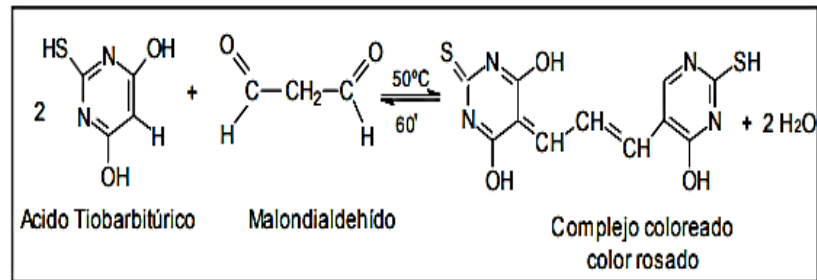
La LP produce también descenso en la fluidez, fallos en el potencial de membrana, aumento de la permeabilidad a H<sup>+</sup> y otros iones, ruptura de la membrana y derivados de la fragmentación como el malondialdehído (MDA).<sup>46</sup>

### 1.9.3.1. MALONDEHALDEHÍDO

El MDA es un biomarcador y aldehído producto de LP. Es altamente tóxico y puede ser cuantificado al formar un producto coloreado por la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), cuantificándose por espectrofotometría o HPLC. Se utiliza este marcador para medir el daño oxidativo, ya que su vida media y alta reactividad permiten su acción tanto extracelular como intracelular, interactuando con proteínas, lípidos y ADN. Existen métodos para cuantificar el MDA como el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).<sup>47</sup>

#### 1.9.3.1.1. ENSAYO DE TBARS

Es un método espectrofotométrico, que cuantifica MDA. Se basa en la reacción de MDA sobre el grupo metileno de TBA en un medio ácido y a altas temperaturas, en relación 1:2 MDA: TBA. (**Figura 5**) Se forma un complejo rosa que puede ser cuantificado colorimétricamente, donde el pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm.<sup>48</sup>



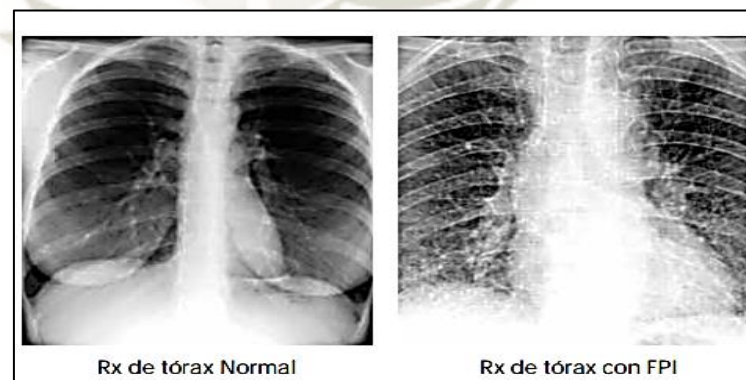
**Figura 5.** Esquema de reacción entre el MDA y TBA.<sup>48</sup>

## 1.10. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la IPF puede tener un retraso de varios meses por ser asintomática en su etapa inicial o presentar síntomas; como tos seca, disnea y alteraciones radiográficas que pueden asemejarse a otras enfermedades respiratorias. Por lo que son necesarias una serie de pruebas útiles para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad.<sup>49</sup>

### 1.10.1. RADIOGRAFIA DE TORAX

Es una prueba inicial, simple y básica realizada en pacientes con sospecha de IPF. El signo radiológico que se observa al inicio de la patología es la del parénquima con áreas densas y blancas, donde se observa la reducción radiográfica de los volúmenes pulmonares. Sin embargo, esta prueba es inespecífica y pueden no observarse cambios en estadios iniciales; por lo que es indispensable el empleo de otras pruebas.<sup>32</sup> (**Figura 6**)



**Figura 6.** Radiografía de Tórax de un paciente normal frente a un paciente con IPF.<sup>50</sup>

### **1.10.2. PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR**

Las pruebas de función pulmonar (PFTs) determinan la función general de los pulmones, miden el volumen de aire pulmonar, el movimiento de aire inhalado y exhalado en los pulmones. Las pruebas de PFTs son indispensables en el diagnóstico, pronóstico y grado de afección pulmonar.<sup>51</sup> Los resultados informan la gravedad de la enfermedad y ayudan a monitorizar la evolución de la enfermedad.<sup>50</sup>

### **1.10.3. ESPIROMETRÍA FORZADA**

Esta prueba mide el flujo del aire utilizando un espirómetro que detecta la cantidad de aire inhalado y exhalado a través de la FVC, que es la cantidad de aire que puede ser expulsado después de la inhalación profunda. La prueba también mide el grado de obstrucción bronquial; su valor es el más importante en el pronóstico y evolución de IPF en que suele estar reducido.<sup>50</sup>

### **1.10.4. PRUEBAS DE CAPACIDAD DE DIFUSIÓN**

La capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) refleja el estado del espacio intersticial donde se realiza el intercambio de gases y la facilidad con la que el oxígeno pasa de los alvéolos al sistema sanguíneo y viceversa. La mayoría de los pacientes con IPF tienen una DLCO reducida. La FVC y la DLCO son importantes indicadores de la gravedad de la enfermedad.<sup>50</sup>

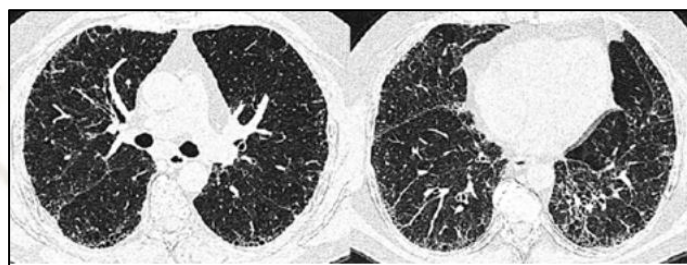
### **1.10.5. PRUEBA DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DE ALTA RESOLUCIÓN**

La tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), es una prueba indiscutible en el diagnóstico de la IPF.<sup>42</sup> La TCAR proporciona imágenes más nítidas, detalladas y tridimensionales de áreas pulmonares, donde se observan las características estructurales producto de IPF. Realizando un diagnóstico temprano y preciso, puede ayudar también a descartar otras enfermedades.<sup>35,52</sup>

El consenso oficial ATS/ERS/JRS/ALAT del 2011 estableció que, en la TCAR, el diagnóstico de certeza de la IPF se basa en la identificación de 4 hallazgos típicos: 1) La afectación pulmonar debe tener un predominio basal y una localización subpleural. 2) Presencia de reticulación evidente. 3) Existencia de panal de abeja con/sin bronquiectasias de tracción. 4)



Demostrar la ausencia de hallazgos considerados excluyentes de un patrón de IPF.<sup>35,42,52</sup> **(Figura 7)** La panalización (panal de abejas), es un hallazgo imprescindible para diagnóstico de IPF, en caso de no observarse, el diagnóstico definitivo se realiza por biopsia pulmonar.<sup>42</sup> La TCAR permite también valorar la presencia de, enfisema, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón y asbestosis.<sup>35,50</sup>



**Figura 7.** Patrón característica de IPF por TCAR.<sup>52</sup>

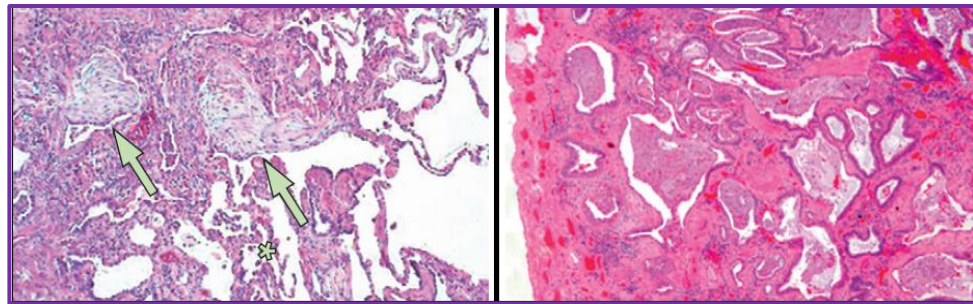
#### 1.10.6. BIOPSIA PULMONAR

La biopsia pulmonar (BP), es un procedimiento quirúrgico definitivo y específico en los casos en los que la TCAR no muestra un patrón certero de

PATRÓN UIP (TODOS LOS CRITERIOS)	PROBABLE UIP	POSIBLE UIP (TODOS LOS CRITERIOS)	NO UIP (TODOS LOS CRITERIOS)
1. Evidencia de fibrosis marcada/ distorsión de la arquitectura +/- panal de abejas de predominio subpleural/distribución paraseptal.	1. Evidencia de fibrosis marcada, distorsión de la arquitectura +/- panal de abejas.	1. Parche o involucro difuso del parénquima pulmonar por fibrosis con o sin inflamación intersticial.	1. Membranas hialinas. 2. Neumonía organizada. 3. Granulomas.
2. Presencia de parches de pulmón y fibrosis.	2. Ausencia de cualquier parche o foco de fibroblastos pero no ambos.	2. Ausencia de otros criterios para UIP (ver el patrón de UIP).	4. Marcada inflamación lejos de penalización.
3. Presencia de focos de fibroblastos.	3. Ausencia de características en contra de UIP (ver 4ta columna) o solo cambios de panal de abeja.	3. Ausencia de características en contra de UIP (ver 4ta columna).	5. Centrado a la vía aérea.
4. Ausencia de características en contra del diagnóstico de UIP (ver la 4ta columna).			6. Otras características sugestivas de un diagnóstico alternativo.

**Cuadro 1.** Características histológicas en biopsia de pacientes con IPF.<sup>50</sup>

IPF.<sup>50</sup> Actualmente, sólo el 20-30% de los casos de IPF requieren valoración histológica para su diagnóstico definitivo.<sup>49</sup> **(Cuadro 1) (Figura 8)**



**Figura 8.** Patrón histológico típico de UIP. <sup>1</sup>

## 1.11. TRATAMIENTO

Hasta que no se tuvo información sobre la etiología de la enfermedad los tratamientos eran principalmente paliativos para mejorar la calidad de vida de los pacientes<sup>39</sup> y en la fase avanzada de la enfermedad, a la paliación de los síntomas.<sup>53</sup> Una vez conocido la importancia que tienen los procesos fibróticos en la enfermedad se ha podido constituir una diana para lograr una mejoría de la enfermedad.<sup>39</sup>

En el Perú, EsSalud cuenta con azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, n-acetilcisteína y prednisona como alternativas de mejor terapia de soporte para pacientes con FPI.<sup>14</sup>

No se ha demostrado que los fármacos citotóxicos (ciclofosfamida, azatioprina, etc.) mejoren la función pulmonar o la esperanza de vida y pueden estar asociados con efectos secundarios nocivos.<sup>40</sup> Al contrario de otras DPLD, los pacientes con IPF no parecen responder a los tratamientos clásicos antiinflamatorios.<sup>17</sup>

### 1.11.1. MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON IPF

El manejo clínico del paciente con IPF implica: determinar el estadio de la enfermedad, establecer un diagnóstico preciso a través de una cuidadosa revisión multidisciplinaria, evaluar los factores pronósticos, tratar las comorbilidades comunes, establecer ejercicios estructurados y educación a través de clases formales de rehabilitación pulmonar,<sup>9,13</sup> tratar los síntomas como tos, disnea y complicaciones como insuficiencia cardíaca derecha,<sup>40</sup> infecciones, etc. y en la enfermedad progresiva o avanzada, evaluar la idoneidad para el trasplante de pulmonar.<sup>1</sup> En ausencia de terapias efectivas, todos los pacientes con FPI deben ser evaluados para los ensayos clínicos de nuevos fármacos.<sup>9</sup>

### **1.11.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

El tratamiento farmacológico generalmente se basa en tratar los síntomas, especialmente la tos y la disnea;<sup>13</sup> se ha observado que la administración de codeína y otros opiáceos junto con glucocorticoides a dosis bajas (prednisona) son eficaces a esos síntomas.<sup>39</sup>

#### **1.11.2.1.N-ACETILCISTEÍNA**

La N-Acetilcisteína (NAC) actúa aumentando la síntesis de glutathione el cual a su vez es un potente mediador antioxidante. Gracias a esta acción disminuye así la respuesta fibrótica.<sup>39</sup> Este fármaco ha estado en uso clínico como terapia mucolítica en una variedad de enfermedades respiratorias como en el tratamiento de la sobredosis de paracetamol.<sup>40</sup>

La NAC, es usado en combinación con prednisona y azatioprina, reduciendo la tasa de disminución de la capacidad vital forzada y la capacidad de uso de monóxido de carbono después de 12 meses de tratamiento. Sin embargo, los cambios observados tienen una significación clínica incierta.<sup>1</sup>

### **1.11.3. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO**

#### **1.11.3.1. TRASPLANTE PULMONAR**

Hasta la fecha, a pesar de los ensayos clínicos en curso, la única terapia efectiva para la fibrosis pulmonar en el campo clínico es el trasplante pulmonar (TP), que está cargado con riesgos significativos y complicaciones a corto y largo plazo.<sup>5</sup>

Lo más idóneo sería realizar el TP en el momento en el que está justificado por el mal pronóstico de la enfermedad a corto o medio plazo, pero no tan tarde para que el deterioro físico del paciente haga previsible que no soportará la intervención.<sup>13</sup>

Según las directrices de la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón (SITCP), se recomienda que los pacientes con IPF

deben ser indicados para el trasplante, si su DLCO es  $< 40\%$ , y si durante los 6 meses anteriores al trasplante han sufrido una disminución de la FVC  $> 10\%$ , o si la oximetría de pulso muestra una saturación  $< 88\%$  durante la prueba de marcha de los 6 minutos.<sup>13</sup>

La edad avanzada, junto con la frecuencia de comorbilidades, es decir, HTP, enfermedad cardíaca, aumentan las complicaciones y los riesgos asociados con la cirugía.<sup>54</sup> La tasa de supervivencia a 1, 5 y 10 años es del 74, 45 y 22% respectivamente.<sup>39</sup>

#### **1.11.3.2.OXIGENOTERAPIA DOMICILIARIA**

La IPF causa disnea de esfuerzo principalmente debido a aumentos en el trabajo de respiración y alteraciones en la capacidad de intercambio de gases e hipoxemia. En este contexto, la oxigenoterapia suplementaria es útil ya que puede disminuir la disnea y mejorar la tolerancia al ejercicio.<sup>54</sup> Es adecuado administrar oxigenoterapia domiciliaria ante la constatación de hipoxemia significativa en reposo o en la PM6M ( $SpO_2 \leq 88\%$ ).<sup>39</sup>

#### **1.11.3.3.REHABILITACIÓN PULMONAR**

El entrenamiento generalmente incluye ejercicios de respiración, acondicionamiento físico y manejo de la ansiedad y la depresión.<sup>54</sup> Los últimos estudios plantean que se observa una mejoría mayor cuando la enfermedad es leve; por ello, se aconseja incluir a los pacientes con FPI en un programa de rehabilitación respiratoria lo antes posible para obtener a largo plazo mejores resultados.<sup>39</sup> La rehabilitación pulmonar es esencial para ayudar a los pacientes a controlar su afección y mantener la mejor calidad de vida posible.<sup>54</sup>

#### **1.11.4.NUEVAS TERAPIAS**

Finalmente en el 2014, dos grandes ensayos clínicos de fase 3 han proporcionado evidencia sólida de que la Pirfenidona, un compuesto con propiedades antifibróticas, antioxidantes y antiinflamatorias, y el Nintedanib, un inhibidor de la tirosinasa con selectividad para el factor de crecimiento

endotelial vascular, factor de crecimiento derivado de plaquetas y los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, pueden ralentizar la disminución funcional y la progresión de la enfermedad con un perfil de seguridad aceptable.<sup>53</sup>

#### **1.11.4.1.TERAPIA CELULAR**

Los estudios van encaminados a implantar células alveolares las cuales se encargan de regenerar el epitelio alveolar. Las más estudiadas y empleadas son las células madres mesenquimales ya que pueden diferenciarse en multitud de tipos celulares diferentes.<sup>39</sup>

#### **1.11.5. PERSPECTIVA EN EL TRATAMIENTO**

La mejora en la comprensión de la patogénesis de la IPF permite identificar nuevas dianas terapéuticas en la búsqueda de fármacos con propiedades antifibróticas y poner en marcha ensayos clínicos rigurosos y bien diseñados en esta enfermedad.<sup>12</sup> En el desarrollo de la fibrosis pulmonar intervienen numerosas citoquinas, como la IL-1, el TNF  $\alpha$ , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y TGF- $\beta$ . La liberación de estas citocinas proinflamatorias con capacidad fibrogenética en las fases iniciales de la IPF, hacen que sean objetivos de tratamiento dirigidos a ese nivel.<sup>12</sup>

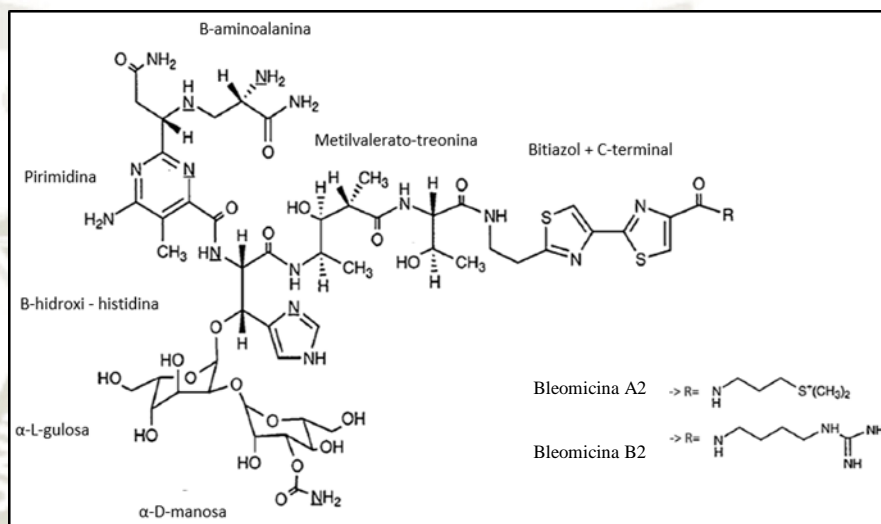
El desarrollo de fármacos se ha centrado en la fibrogénesis y la fibroproliferación, y un número cada vez mayor de terapias dirigidas se encuentran en ensayos clínicos en fase temprana. Parece probable que el panorama terapéutico para IPF cambie drásticamente en la próxima década.<sup>9</sup>

## **2. LA BLEOMICINA**

La bleomicina (BLM), es un medicamento utilizado como agente antineoplásico por su efecto inmunosupresor mínimo en patologías como enfermedad de Hodgkin, carcinoma testicular y de cabeza, pene, cuello uterino y vulva. Pero su eficacia terapéutica se encuentra limitada ya que produce toxicidad pulmonar e induce fibrosis pulmonar (FP) y neumonitis.<sup>5,55</sup>

## 2.1. ESTRUCTURA

La BLM es un glicopéptido,<sup>4</sup> presenta dominios de unión a metales, ADN y carbohidratos. La sección de unión a metales, contiene átomos de nitrógeno y forma un complejo octaédrico con estos. En la sección de unión al ADN, la pirimidina y el grupo bitiazol, contribuyen a la unión electrostática entre ADN y BLM. En las secciones de carbohidratos se desconoce la función, pero está en estudio la actividad moduladora de BLM en ADN.<sup>55</sup> (**Figura 9**)



**Figura 9.** Estructura química de Bleomicina.<sup>5</sup>

## 2.2. FARMACOCINÉTICA

La absorción de BLM es muy baja en el tracto gastrointestinal por lo que su administración es parenteral, su distribución se produce en la piel, pulmones, riñones y vasos linfáticos. Solo el 10% de una dosis se une a proteínas plasmáticas, en los espacios intracelulares y extracelulares. La excreción de la BLM se produce por vía renal a través de la orina en un porcentaje de 45-70% durante las primeras 24 horas.<sup>5</sup>

## 2.3. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción exacto de la BLM es desconocido. Se conoce que su forma activada ejerce un efecto citotóxico y produce daño en el ADN y ARN debido a la producción de ROS y RNS.<sup>5,55</sup> En el ADN se produce un daño en la cadena simple y doble hélice, que altera la morfología de los cromosomas, de esta manera se dañan las células tumorales e interrumpen el ciclo celular.<sup>40,56</sup>

### 2.3.1. HIDROLASA DE BLEOMICINA

Es una proteasa de cisteína que actúa como enzima inactivadora de BLM, al desaminarla, su producto metabólico deamido-bleomicina carece de citotoxicidad y es incapaz de cortar el ADN. Los tejidos con altos niveles de esta enzima (hígado bazo y medula ósea) son menos susceptibles a los efectos de la BLM.<sup>55</sup>

## 2.4. TOXICIDAD PULMONAR

El sistema respiratorio, por su doble exposición al sistema circulatorio y al medio ambiente, representa un blanco excelente para la toxicidad por los fármacos. Los pulmones al poseer una alta tensión de O<sub>2</sub>, incrementan la producción de RL de O<sub>2</sub> y facilitan la aparición de reacciones tóxicas.<sup>57</sup> La BLM puede conducir neumonitis intersticial la cual se agrava en la IPF. La toxicidad depende de la dosis, edad del paciente y el daño pulmonar previo.

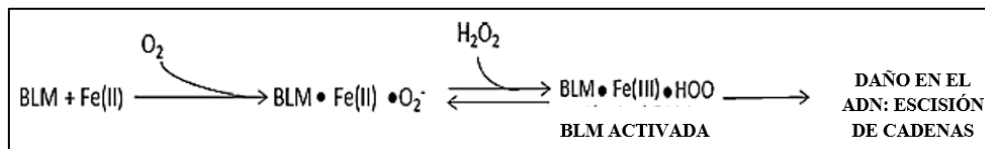
### 2.4.1. DAÑO EPITELIAL PULMONAR INDUCIDO POR BLM

El daño y desarrollo de IPF se produce cuando las células del epitelio alveolar consideradas como blanco de BLM, son inducidas a muerte celular por apoptosis debido a la producción de RL que alteran el estado de oxidación celular. Se produce un desequilibrio en el metabolismo de la matriz extracelular evidenciado por la excesiva acumulación de colágenas en el parénquima pulmonar, que carece de hidrolasa de BLM. Se produce también, infiltrado de células inflamatorias en los alveolos y septos alveolares, así como daño endotelial desencadenando una serie de daños histopatológicos.<sup>58</sup>

### 2.4.2. MECANISMO DE LESIÓN PULMONAR POR BLM EN LA IPF

El daño por escisión del ADN, ocurre por la quelación de iones metálicos (Fe<sup>+2</sup>) y la reacción de una pseudoenzima formada con oxígeno,<sup>40</sup> (**Figura 10**) el cual somete a ciclos redox y cataliza la formación de ROS<sup>3</sup> en el interior de la célula,<sup>13</sup> por ejemplo: superóxido e hidroxilo que indirectamente causaran daño el ADN y otros componentes celulares.<sup>13,59</sup> Una sobreproducción de ROS puede conducir a una respuesta inflamatoria que causa toxicidad pulmonar, activación de fibroblastos y fibrosis posterior.<sup>40</sup> Está bien documentado que los RL, una vez producidos, se dirigen a

biomacromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos, con esta última progresión de la peroxidación de lípidos, lo que causa daño pulmonar.<sup>3</sup>



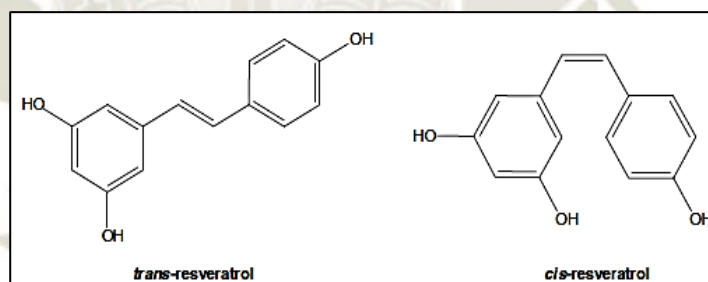
**Figura 10.** Activación de BLM por el Hierro y Oxígeno.<sup>5</sup>

### 3. RESVERATROL

El resveratrol (RSV), es un compuesto antioxidante presente en más de 70 especies de plantas como los arándanos, grosellas, moras y uvas.<sup>7,56</sup> Como un mecanismo de defensa de la planta, la producción del RSV, una fitoalexina, puede ser desencadenado/ producido en respuesta a hongos, radiación UV, sales metálicas, bacterias, etc.<sup>20</sup>

#### 3.1. ESTRUCTURA

El RSV ó 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, es un polifenol con estructura estilbeno, formado por la unión de dos anillos fenólicos, cuyo peso molecular es 228,25 g/mol.<sup>7</sup> Su doble enlace estireno es responsable de su isómeros *cis* y *trans*.<sup>60</sup> (**Figura 11**)



**Figura 11.** Estructura química del trans-resveratrol el cis-resveratrol.<sup>7</sup>

#### 3.2. FARMACOCINÉTICA DEL RSV

La absorción de RSV se produce a nivel intestinal por difusión pasiva o a través transportadores de membrana; en sangre puede presentarse en tres formas diferentes: como glucurónico, sulfatado y libre, estos complejos pueden disociarse en membranas celulares, dejando libre el RSV para que ingrese a las células. En el torrente sanguíneo puede ser distribuido en tejidos sin embargo su biodisponibilidad es muy baja, por ello no presenta la acción deseada. Su absorción varía en función de los alimentos ingeridos y su eliminación se da por vía renal.<sup>7</sup>



### 3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

#### 3.3.1. EFECTO ANTIOXIDANTE

El RSV tiene propiedades antioxidantes, este actúa frente a las ROS neutralizando directamente los RL, sin embargo, sus efectos son muy débiles y no muy efectivos al eliminarlos. Por tal motivo RSV presenta un mecanismo mucho más eficiente al inducir la activación de enzimas antioxidantes, manteniendo la función vascular y celular. Los mecanismos por los cuales aumenta la expresión enzimática, no es clara y está en estudio.<sup>60</sup> Su actividad antioxidante también puede darse por las vías que activan la transcripción de genes antioxidantes como la catalasa o superóxido dismutasa (SDO).<sup>33</sup>

#### 3.3.2. EFECTOS ANTINFLAMATORIO

El RSV ejerce efectos antiinflamatorios beneficiosos en diversas patologías como enfermedades cardiovasculares o diabetes, al inhibir la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios como el TNF- $\alpha$  o el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).<sup>60</sup> *In vitro*, el RSV tiene la capacidad de inhibir enzimas antiinflamatorias como ciclooxigenasa y lipooxigenasa. También inhibe la formación de edemas y la inflamación por radiación UV.<sup>56,61</sup>

#### 3.3.3. EFECTOS SOBRE LIPOPROTEÍNAS

El resveratrol es capaz de disminuir la peroxidación a través de mecanismos, por ejemplo, inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), por lo que podría prevenir aterosclerosis, mejorar el perfil lipídico del organismo y prever la adhesión de leucocitos al endotelio.<sup>60,62</sup>

## 4. MODELOS ANIMALES

Los modelos animales experimentales son necesarios ya que permiten la investigación *in vivo* de mecanismos patológicos.<sup>5</sup> Un modelo de animal ideal debe imitar lo más posible una enfermedad humana, ser reproducible y consistente, fácil de realizar, ampliamente accesible y no demasiado costoso. Las ventajas generales de los modelos animales se refieren a la capacidad de reproducir complejas interacciones genéticas, bioquímicas, ambientales y fenotípicas.<sup>5</sup>

Los modelos animales son requisitos previos esenciales para la posterior aplicación de pruebas de pronóstico e intervenciones terapéuticas.<sup>16</sup>

#### **4.1. MODELO ANIMAL DE IPF**

Hasta la fecha no hay modelos animales capaces de imitar todas las características típicas de la IPF detectada en humanos,<sup>5</sup> ni recapitular el patrón histológico de UIP mostrando características de la enfermedad progresiva.<sup>16</sup>

La patogenia de cada forma de fibrosis pulmonar sigue siendo poco conocida. Para comprender mejor la patogénesis de los trastornos fibróticos pulmonares, se han desarrollado múltiples modelos animales.<sup>63</sup>

##### **4.1.1. EL MODELO MURINO DE BLM**

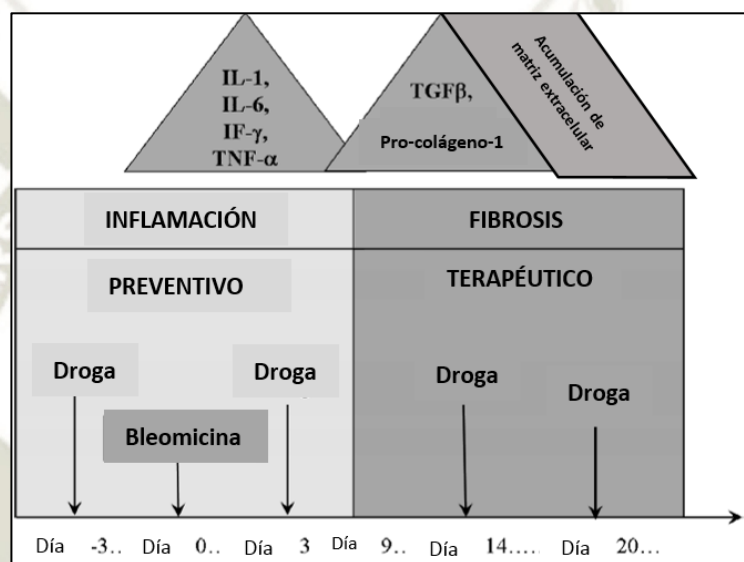
La BLM como una agente para inducir fibrosis pulmonar experimental, fueron descritas primeramente en perros,<sup>64</sup> más tarde en ratones<sup>65</sup> y ratas.<sup>66</sup> El modelo de bleomicina se utiliza comúnmente para estudiar las vías moleculares de la fibrosis pulmonar. Sin embargo, los cambios patológicos observados en este modelo no recapitulan los que se observan en la fibrosis pulmonar idiopática.<sup>9</sup> El aspecto de la progresión lenta e irreversible de la FPI en pacientes que evoluciona en años no se reproduce en el modelo de bleomicina, que evoluciona en meses.<sup>9,40</sup>

Actualmente, el modelo BLM de fibrosis pulmonar representa el modelo animal de IPF más barato, más fácil, más rápido, más reproducible y, por lo tanto, el más extensamente utilizado; ventajas que superan la desventaja de la representación mínima de la enfermedad humana. Hasta ahora, nos ha proporcionado información invaluable sobre la patogénesis, el pronóstico, el tratamiento,<sup>16</sup> las vías implicadas en la enfermedad y nos ha permitido mejorar nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen a la enfermedad,<sup>67</sup> así como dilucidar las funciones de las citoquinas, los factores de crecimiento y las vías de señalización implicadas en la fibrosis pulmonar.<sup>40</sup> Sin este conocimiento, sería una tarea aún más desalentadora para diseñar ensayos clínicos y posibles terapias para IPF.<sup>67</sup>

Aunque el modelo de fibrosis pulmonar con bleomicina puede usarse para identificar mediadores que tienen el potencial de causar fibrosis pulmonar,

los hallazgos en animales necesitan confirmación en estudios de traslación en enfermedades pulmonares fibróticas en humanos.<sup>9</sup>

El modelo BLM a menudo se critica sobre la base de que los resultados de la investigación no se pueden traducir en ensayos clínicos exitosos. Sin embargo, se opone a esto el hecho de que uno de los compuestos actualmente probados en ensayos clínicos y que muestran alguna promesa se han presentado utilizando el modelo animal de BLM. Estos es la pirfenidona, con actividades antioxidantes y antifibróticas, respectivamente.<sup>67</sup> **(Figura 12)**



**Figura 12.** Secuencia de eventos en la IPF inducido por BLM.<sup>40</sup>

#### 4.1.1.1. VÍA DE ADMINISTRACION DE BLM EN LA INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR:

Con el propósito de examinar los mecanismos y procesos específicos que intervienen en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, el modo de administración de BLM es muy importante,<sup>5</sup> estas pueden ser: intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal o subcutánea.<sup>67</sup> **(Cuadro 2)** El modelo animal más común para la IPF incluye una sola administración intratraqueal de BLM al pulmón. Esta administración generalmente resulta en un daño dosis-dependiente, caracterizado por infiltración de células inflamatorias, deposición de colágeno y consolidación parenquimal.<sup>68</sup>

En el 2012, Kristina Rydell-Tormanen y col. reprodujeron el modelo murino de IPF administrando BLM por vía subcutánea, logrando establecer características típicas de la enfermedad hasta por un periodo de 6 y 8 semanas.<sup>69</sup> Por otro lado, en el 2016, Heba E. Essa., trabajaron en el mismo modelo, pero por vía intraperitoneal, logrando evidenciar características típicas de la enfermedad, durante 6 y 8 semanas de experimentación.<sup>70</sup>

#### **4.1.1.1.1.DOSIS DE BLM EN EL MODELO DE IPF**

Las dosificaciones basadas en los pesos son las más comunes, comenzando por 1.25 U/Kg y hasta un máximo de 4 U/Kg.<sup>16</sup> Esta dosis generalmente se suspende en 50-100  $\mu$ L de solución salina tamponada con fosfato para la instilación intratraqueal. Peng y col., en el 2013 realizaron experimentos de escalas de dosis de BLM con tasas de mortalidad del 19% con 3 U/Kg y del 50% con 5 U/Kg. Una dosis ligeramente inferior de 2.0-2.5 U/Kg parece proporcionar la dosis más efectiva al modelo de fibrosis pulmonar.<sup>71,72</sup>

#### **4.1.1.1.2.INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL DE BLM EN LA INDUCCIÓN DE IPF**

Esta vía de administración es la más común y más estudiada; es posible hipotetizar que la BLM puede inducir daño pulmonar en dos fases:

La primera fase, caracterizada por un componente inflamatorio predominante dentro de las 2 semanas de la administración del fármaco;<sup>5</sup> a los tres días tras la instilación IT, se produce un aumento de celularidad en los septos alveolares debido a la infiltración de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos,<sup>13</sup> causando una elevación inicial de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6).<sup>5,40</sup> Entre el 6º día y un mes tras la instilación IT, se produce un progresivo incremento de linfocitos que pueden liberar factores profibróticos, con posterior inducción de la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno,

liberando factores de crecimiento profibrogénicos.<sup>13</sup> A las 2 semanas tras la instilación IT, cuando la inflamación se resuelve,<sup>67</sup> aparecen cambios difusos y multifocales fibrosis intersticial e intraalveolar. La segunda fase, tras la 3ª semana de la instilación IT; etapa fibrótica, aparecen grandes focos de fibrosis en forma difusa, caracterizados por la presencia de fibroblastos, miofibroblastos, acumulación excesiva de colágeno en la matriz extracelular<sup>13,67</sup> y aumento en la expresión de marcadores profibróticos (TGF- $\beta$ 1, procolágeno-1) que persiste hasta la cuarta semana<sup>5,40</sup> La ventaja de la administración intratraqueal es que una sola dosis de BLM en roedores puede estimular la lesión pulmonar y la fibrosis resultante ocurre una semana después de la administración. El inicio de la fibrosis en este modelo se puede observar bioquímicamente e histológicamente el día 14, con una respuesta máxima generalmente registrada alrededor de los días 21-28.<sup>5</sup>

	<b>Intratraqueal</b>	<b>Intravenoso</b>	<b>Intraperitoneal</b>	<b>Subcutánea</b>
<b>U/kg</b>	1.25 - 4U/kg	30U/kg	15-35U/kg dependiendo en el plan de dosificación	150U/kg
<b>Características</b>	Daño directo al epitelio pulmonar	Dos veces/semana (4-8semanas). Daño al endotelio, seguido por lesión epitelial. Fibrosis Subpleural	Fibrosis Subpleural	Sitio de inyección en la espalda del animal
<b>Ventajas</b>	Única Instilación, corto periodo de tiempo necesario para el desarrollo de la enfermedad	Clínicamente relevante	Clínicamente relevante	A semeja la naturaleza progresiva de fibrosis en un corto periodo de tiempo.
<b>Desventajas</b>	Respuesta auto limitante después de 28 días	No aplicable en todos los animales. Largo periodo de tiempo para el desarrollo de la enfermedad	Múltiples dosis requeridas	Inyecciones diarias/bomba micro osmótica de instilación requerida.

**Cuadro 2.** Vías de administración de BLM.<sup>5</sup>

#### 4.1.2. OTROS MODELOS DE IPF

Los métodos comunes incluyen daño por radiación, instilación de bleomicina, sílice o asbesto, con FITC y modelos relacionados a la edad. **(Cuadro 3)** Aunque existen ventajas y desventajas entre ellos; **(Cuadro 4)** hasta ahora el agente estándar para la inducción de la fibrosis pulmonar experimental en animales es la BLM.<sup>40</sup>

##### 4.1.2.1. ASBESTOSIS

La asbestosis continúa siendo una importante enfermedad fibrótica pulmonar en humanos expuestos. La asbestosis humana y la IPF son similares en su distribución bruta, y comparten una histopatología UIP común. En términos de su principal diferencia, la asbestosis implica menos focos miofibroblásticos que la IPF,<sup>63</sup> cuerpos de asbesto incrustados dentro del tejido fibroso y fibrosis de la pared bronquial,<sup>16</sup> lo cual puede explicar la progresión más lenta de la asbestosis en comparación con la IPF.<sup>63</sup>

##### 4.1.2.2. SÍLICE

La instilación de sílice en pulmones murinos, da como resultado el desarrollo de nódulos fibróticos que se parecen a la fibrosis nodular silicótica simple, que se desarrolla en humanos después de algunas exposiciones ocupacionales,<sup>63</sup> de minerales y aerosoles en partículas.<sup>16</sup> La mayor ventaja del modelo de sílice de la fibrosis pulmonar es la persistencia de lesiones fibróticas debido a la disminuida remoción de las partículas de sílice de los pulmones.<sup>16</sup>

##### 4.1.2.3. ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) también se ha utilizado como un modelo de lesión pulmonar que conduce a la fibrosis. La administración intratraqueal de FITC a los pulmones da como resultado permeabilidad alveolar y vascular, que culmina en fibrosis pulmonar dentro de los 14 a 21 días. En lo que es quizás el aspecto más útil del modelo, FITC se conjuga con proteínas parenquimatosas y permanece persistentemente localizado en las áreas de lesión inicial.<sup>63</sup>

#### 4.1.2.4. MODELO DE FIBROSIS PULMONAR

##### RELACIONADO A LA EDAD

Avances en investigaciones demuestran un aumento de fibrosis dependiente de la edad, que se asemeja más a la patogénesis de la FPI humana. Recientes estudios han demostrado mayor susceptibilidad en ratones viejos que en los más jóvenes a la lesión inducida por BLM, y que los ratones machos envejecidos pueden ser más sensibles que las hembras en el mismo modelo.<sup>63</sup>

**Cuadro 3.** Mecanismos patogénicos en modelos animales de IPF.<sup>63</sup>

MODELO	CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS
<b>Asbesto</b>	Lesión de células epiteliales, focos fibroblásticos, estrés oxidativo de los macrófagos, capacidad para visualizar la deposición de fibras.
<b>Sílice</b>	Habilidad para visualizar la deposición de partículas.
<b>Bleomicina</b>	Lesión celular directa por daño en el ADN, el sitio inicial de la lesión se puede determinar a través del método de administración, hiperplasia AEC en modelo de dosificación repetitiva y resolución en modelo de dosis única.
<b>FITC</b>	Lesión AEC, fuga vascular
<b>Fibrosis dependiente de la edad</b>	Estrés epitelial en respuesta a la lesión, los fibroblastos en pulmones envejecidos están preparados para responder bien a la señalización de TGF- $\beta$ y las infecciones naturales con herpes virus causan fibrosis en ratones de edad avanzada, pero no jóvenes.

**Cuadro 4.** Ventajas y desventajas de modelos animales para el estudio de fibrosis pulmonar.<sup>16</sup>

<b>MODELOS MURINOS</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>Bleomicina</b>	Forma molecular temprana más similar a la fase aguda acelerada de la FPI en humanos	Los ratones jóvenes se recuperan espontáneamente a menos que se administre dosis repetitivas
<b>Sílice</b>	Buen modelo de lesión pulmonar en humanos y persistencia en lesiones fibróticas.	Falta de reproducibilidad, administración difícil, tiempo prolongado de fibrosis, ausencia de lesiones usuales de neumonía intersticial (UIP)
<b>Asbestosis</b>	Recapitula la exposición al asbesto en la fibrosis pulmonar humana.	El modelo requiere al menos un mes para que se desarrolle la fibrosis. La dosis única intratraqueal conduce a fibrosis central en lugar de subpleural, desigualmente distribuida entre los pulmones
<b>Sobreexpresión de citocinas</b>	Capacidad para diseccionar eventos de señalización en sentido descendente relevantes a específicos. Citocinas fibróticas	Modelos limitados a la exclusión de vías específicas, en lugar de recapitular la complejidad de la enfermedad humana.
<b>Isotiocianato fluorescente</b>	Fenotipos fibróticos relativamente reproducibles y persistentes.	Carecen del patrón de UIP representativo e infiltrados inflamatorios precedido de fibrosis





# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. LUGAR DE ESTUDIO

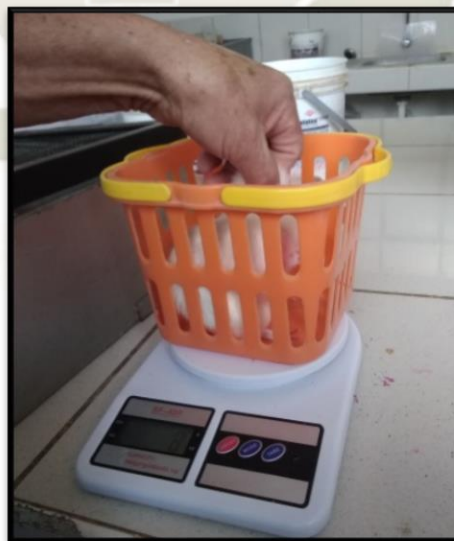
El presente trabajo se realizó en los siguientes ambientes de la Universidad Católica de Santa María (UCSM): laboratorio de ensayo y control de calidad H-201, bioterio y clínica veterinaria de la UCSM, así como en la unidad de mezclas oncológicas (UMO) del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo – EsSalud, laboratorio de patología de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA) ubicados en la ciudad de Arequipa, Departamento Arequipa- Perú y el laboratorio de patología del Hospital EsSalud III ubicado en la ciudad de Juliaca, departamento de Puno- Perú, durante los meses de junio a agosto del 2018.

#### 1.2. TIPO DE ESTUDIO

El estudio presente es cuantitativo, cualitativo, experimental y comparativo.

#### 1.3. UNIDADES DE ESTUDIO

El proyecto de investigación se realizó con animales de experimentación, constituido por 24 ratas *Wistar* machos, con un peso promedio entre 294 a 305g (**Figura 13**) de tres meses de edad, obtenidas del bioterio de la UCSM.



**Figura 13.** Control del peso de los animales de experimentación.

#### 1.4. ORGANIZACIÓN DE LAS UNIDADES DE ESTUDIO

Los animales de experimentación fueron divididos en 2 grupos A y B, compuestos de 12 ratas cada uno y subdivididos en 3 subgrupos ambos, de la siguiente manera (**Cuadro 5**):

- a. **SUB GRUPO CONTROL POSITIVO (G1):** Constituido por 4 ratas, a las cuales se les indujo fibrosis pulmonar mediante una única administración intratraqueal de BLM a una dosis de 2.0 mg/Kg de peso.
- b. **SUB GRUPO BLANCO (G2):** Constituido por 4 ratas, a las cuales no se les indujo la enfermedad pulmonar. Estos recibieron solución salina al 0.9% oralmente y de forma diaria. En el caso del Grupo A por 14 días y del grupo B por 30 días.
- c. **SUB GRUPO TRATAMIENTO (G3):** Constituido por 4 ratas, a las cuales se les indujo fibrosis pulmonar y recibieron un tratamiento compuesto por RSV de forma diaria a una dosis de 75mg/Kg de peso por vía oral. En el caso del grupo A por 14 días y del grupo B por 30 días.

**Cuadro 5.** División de los grupos de estudio.

Grupo A	Número de animales (n)	Grupo B	Número de animales (n)
<b>G1:</b> Subgrupo control positivo	n= 4	<b>G1:</b> Subgrupo control positivo	n= 4
<b>G2 :</b> Subgrupo blanco	n= 4	<b>G2 :</b> Subgrupo blanco	n= 4
<b>G3 :</b> Subgrupo tratamiento A	n= 4	<b>G3 :</b> Subgrupo tratamiento B	n= 4

*Fuente: Elaboración propia.*

En el caso del grupo A, el periodo de tiempo de experimentación fue de 14 días y en el caso del grupo B, fue de 30 días. Tiempo en el cual se realizó los sacrificios de las ratas para extraer los pulmones y realizar posteriores procedimientos experimentales.

En la **Figura 14**, se aprecia una línea del tiempo de los procesos experimentales, realizados en el presente trabajo de investigación.

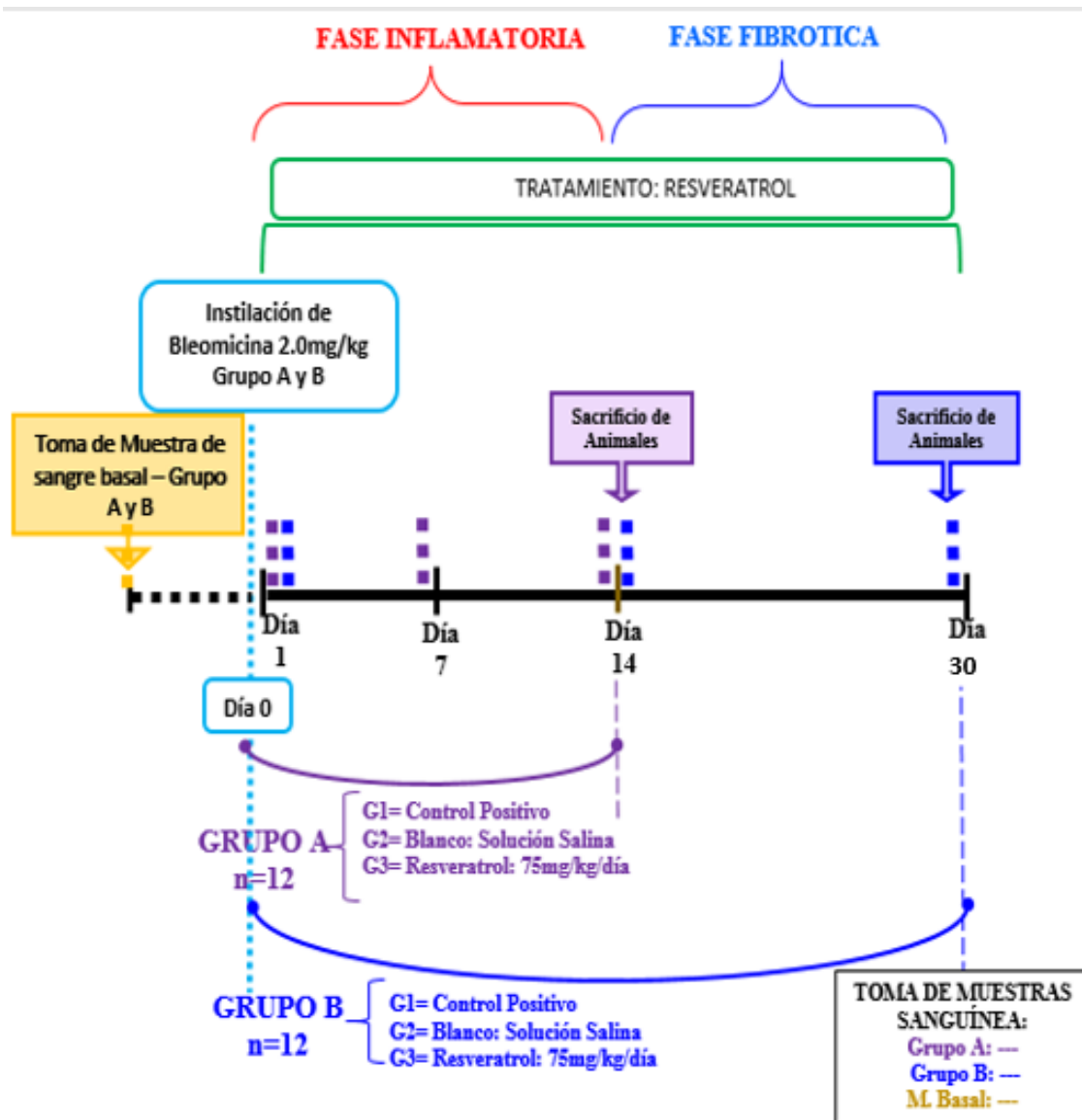


Figura 14. Línea de Tiempo del Proyecto Experimental.

## 1.5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

### 1.5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Constituido por el suero sanguíneo de 24 ratas *Wistar* de experimentación.

### 1.5.2. MATERIAL DE LABORATORIO

#### 1.5.2.1. EQUIPOS

Para el presente trabajo de investigación, se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio: cabina de bioseguridad biológica Clase II A2 (LABCONCO Delta® Series), cámara de oxigenación (MIDWARK VMS®), (Figura 23) medidor de pH (Orion Star™), centrífuga IEC

Centra CL2 (525 A), equipo de baño maría eléctrico GEMCO (YCW-010E), espectrofotómetro UV (Varioskan LUX), (Figura 15) balanzas electrónicas ML204T/A (METTLER TOLEDO), refrigerador FR-093-R (Daewoo), micrófono MT.5505, estufa UN55plus (MEMMERT) y microscopio de luz óptica convencional.



**Figura 15.** Espectrofotómetro (*Varioskan LUX*).

### 1.5.2.2. REACTIVOS

Los reactivos utilizados para la determinación de los niveles de MDA en suero de ratas fueron: ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y tetraetoxipropano (TEP) obtenidos del laboratorio Merck, buffer acetato, butanol, ácido clorhídrico y agua destilada obtenidos del laboratorio de control de calidad de la UCSM. Para el sacrificio de los animales de experimentación se utilizó, cloroformo obtenido del bioterio de la UCSM. Para la conservación de las biopsias pulmonares se utilizó formalina 4% obtenida del laboratorio de control de calidad de la UCSM. Para el procesamiento de las muestras pulmonares se utilizaron, etanol (70°, 95°, 100°) y xilol obtenidos en el laboratorio de patología del hospital EsSalud III, Juliaca. Para realizar las tinciones histológicas se utilizó, hematoxilina eosina (H&E), líquido de Bouin, solución escarlata de Biebrich, fucsina ácida, ácido fosfotúngstico, ácido acético al 1% y azul de anilina, obtenidos del laboratorio de patología del Hospital EsSalud III- Juliaca y el laboratorio de patología de la UNSA.

### 1.5.2.3. MATERIAL

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se utilizaron los siguientes materiales: capilares de extracción no heparinizados, pipetas (0.5,1,5 y 10 mL), beakers (20, 50, 100, 250 y 1000mL), fiolas (5, 10, 25, 100, 250 y 1000mL), micropipeta automática (25-250uL), probetas (50 y 100mL), propipetas, baguetas, tubos de ensayo, gradillas para tubos de ensayo, espátulas, pinzas, micro-placas de 96 pocillos. tubos eppendorf (Merck), tubos falcon (15 y 50 mL), placas petri 100 x 150 mm, bloques discoidales de parafina y moldes plásticos para parafina.

### 1.5.2.4. MATERIAL ANEXO

Sujetador manual para el procedimiento de instilación, estufa eléctrica (2500 SOLE), jeringas (0.5,5,10 y 20 mL), catéter n°22, alcohol 96°, algodón, bajalenguas, barbijos, guantes de nitrilo, guantes quirúrgicos estériles, campos estériles, jaulas metálicas para ratas, bebederos y comedores para ratas, cooler de tecnopor, linternas, hielo, marcadores, tijeras y pinzas.

### 1.5.2.5. FÁRMACOS Y/O TRATAMIENTO

Los anestésicos utilizados para los animales de experimentación fueron: xilacina 2% (XILAGAL) y Ketamina 100mg/mL (KETONAL). El fármaco utilizado para la inducción de IPF fue BLM de 15mg (Perú Lab. S.A.), obtenido del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-SUR). Para la administración de tratamiento a los grupos de estudio, se utilizó RSV de 500mg (Sunvit) y NaCl 0.9% (B. Braun Medical S.A.), obtenidos de la cadena farmacéutica (MIFARMA).

## 2. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN

Los animales fueron agrupados en 4 jaulas de 6 animales cada una. A su vez, estos fueron marcados sobre determinadas áreas del cuerpo (cabeza, pata, lomo, etc.) para su identificación, como se muestra en el **Cuadro 6**.

**Cuadro 6.** Identificación de los Animales de experimentación.

Número de rata	Marca de la rata
1	Cabeza
2	Dorso
3	Cola
4	Pata anterior derecha
5	Pata posterior derecha
6	Pata anterior izquierda
7	Pata posterior izquierda
8	Pata lado derecho
9	Pata lado izquierdo
10	Patas delanteras
11	Patas posteriores
12	Patas cruzadas
13	Cuatro patas
14	Cabeza – dorso
15	Dorso – cola
16	Cabeza – dorso – cola
17	Cabeza pata anterior derecha
18	Cabeza pata posterior derecha
19	Cabeza pata anterior izquierda
20	Cabeza pata posterior izquierda
21	Cola pata anterior derecha
22	Cola pata posterior derecha
23	Cola pata anterior izquierda
24	Cola pata posterior izquierda

*Fuente: Elaboración propia.*

## 2.2. OBTENCIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO

Este procedimiento se realizó en la mañana y previo ayuno de las ratas a partir del día 1, en donde se tomó muestras sanguíneas por venopunción del seno retro-orbital del ojo (técnica de Dartman) utilizando tubos capilares sin heparina de 1.5mm de diámetro. Para ello, se sujetó firmemente a la rata de la piel de cuello y se insertó el capilar en el ángulo externo del ojo (2mm aproximadamente) recolectando 0,5ml de muestra en un tubo eppendorf estéril de 1.5ml de capacidad. Posteriormente, se retiró el capilar y se oprimió ligeramente la zona de punción con algodón para detener la hemorragia. (**Figura 16 y 17**)



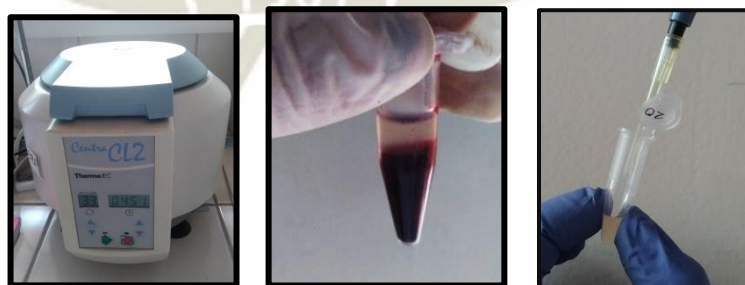
**Figura 16.** Obtención de la muestra.



**Figura 17.** Recolección de las muestras.

### 2.2.1. EXTRACCIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO

Para la extracción de suero sanguíneo, las muestras se centrifugaron a 3000rpm durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se recolectó cuidadosamente el suero (sobrenadante) con la ayuda de micro-pipetas y después se depositó en otro tubo eppendorf limpio y estéril para su posterior análisis. **(Figura 18)**



**Figura 18.** Obtención de Suero sanguíneo.

### 2.2.2. OBTENCIÓN DEL VIAL DE BLM

El vial de BLM de 15mg fue adquirido en la IREN-SUR, ubicado en la ciudad de Arequipa, departamento de Arequipa- Perú; este fue transportado y



conservado en una cadena de frío a una temperatura de 4°C hasta su uso.

(Figura 19)



**Figura 19.** Vial de BLM.

### **2.3. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECONSTITUCIÓN DE BLM**

Los procedimientos para la reconstitución de BLM se llevaron a cabo en el área de UMO del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo EsSalud - Arequipa, el día 10 de Julio del 2018 a las 8:00 horas, utilizando una cabina de seguridad Biológica clase II, para lo cual se cumplió con el siguiente protocolo de bioseguridad:

#### **2.3.1. EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP)**

Se utilizaron los elementos de protección personal: guantes, bata de protección de manga larga con puños ajustados, mascarilla, gorro, cubrezapatos; estos fueron colocadas respetando el siguiente orden: Primeramente, se colocó el gorro y los cubre zapatos y después de limpiarse las manos con una solución hidro-alcohólica al 70% se colocó la mascarilla y a continuación el primer par de guantes de nitrilo por debajo de la bata, seguido de la bata con los puños ajustados y por último el segundo par de guantes de látex sobre el puño de la bata para proteger las muñecas en la manipulación

#### **2.3.1.1. DISTRIBUCIÓN Y RECONOCIMIENTO DEL ÁREA DE MEZCLAS ONCOLÓGICAS**

- a. **Área de pre-ingreso:** Esta área se utilizó para la vestimenta y colocación del EPP.

- b. **Área de recepción, o acondicionamiento (área Gris):** En esta área se recibió el vial de BLM y la solución de NaCl 0.9%; dicha zona actuó como barrera frente a la contaminación.
- c. **Área de preparación (área Blanca):** En esta área se encontró la cabina de Bioseguridad Biológica y fue allí donde se realizó la reconstitución del vial de BLM. **(Figura 20)**



**Figura 20.** Áreas de la Unidad de mezclas Oncológicas.

### 2.3.1.2. CÁLCULO PARA EL AJUSTE DE DOSIS DEL VIAL DE BLM

En primer lugar, el vial de BLM de 15mg se reconstituyó con 5mL de una solución de NaCl al 0.9%, obteniendo una concentración final de 3mg/mL.

$$15\text{mg}/5\text{mL} = 3\text{mg/mL}$$

Para poder inducir la enfermedad pulmonar se requirió administrar intratraquealmente 2.0mg/Kg de peso a las ratas de estudio, por lo que fue necesario ajustar la dosis según sus respectivos pesos de la siguiente manera: tomando como referencia un peso promedio de una rata de 0.300Kg:

$$2\text{mg/Kg} \times 0.300 \text{ Kg} = 0.6\text{mg} \text{ -----} \rightarrow \text{miligramos de BLM requeridos}$$

$$\text{Si: } 3\text{mg} \text{ -----} 1\text{mL} \text{ -----} \rightarrow \text{solución del vial de BLM}$$

$$0.6\text{mg} \text{ -----} X$$

$$X = 0.2\text{mL} \text{ -----} \rightarrow \text{mililitros que se deben tomar para obtener esa concentración}$$

Los volúmenes de la dosis ajustada al peso, tomados del vial de BLM reconstituido se muestran en el siguiente cuadro:

**Cuadro 7.** Volúmenes de dosis ajustadas al peso de los animales de experimentación.

Numero de rata	Peso de rata en kilogramos (Kg)	Volumen en mililitros (mL) tomado del vial de BLM de 3mg/mL
1	0.294	0.196
2	0.295	0.197
3	0.297	0.198
4	0.295	0.197
5	0.298	0.199
6	0.298	0.199
7	0.299	0.199
8	0.301	0.201
9	0.311	0.199
10	0.304	0.199
11	0.308	0.200
12	0.305	0.201
13	0.303	0.202
14	0.305	0.203
15	0.302	0.201
16	0.308	0.205
17	0.297	0.198
18	0.302	0.202
19	0.296	0.197
20	0.300	0.201
21	0.295	0.197
22	0.300	0.201
23	0.302	0.201
24	0.299	0.199

*Fuente: Elaboración propia.*

### 2.3.1.3. RECONSTITUCIÓN DEL VIAL DE BLM

Para la reconstitución del vial de BLM de 15mg se siguió un riguroso protocolo de bioseguridad para la manipulación adecuada el material:

- Se colocó gasas estériles en la superficie de trabajo de la cabina, en caso se produzca algún derrame.
- Mantener el flujo de aire.
- Los materiales estériles como: jeringas de 1mL y la solución antiséptica de etanol al 70%, se ubicaron en la zona central del

interior la cabina y el vial de BLM junto a la solución de NaCl 0.9% en la zona derecha del interior de la cabina.

- Una vez que todo el material estuvo dentro de la cabina, se esperó de 2 a 3 minutos antes de comenzar a trabajar, para que se restablezcan las condiciones de flujo.
- Se esterilizó el tapón del vial de BLM con etanol al 70% y seguidamente fue reconstituido con 5mL de NaCl 0.9%. con una jeringa perforando el tapón del vial por una única vez sin extraer la aguja de este. **(Figura 21)**
- Posteriormente, se agitó el vial para que el contenido se diluyera en su totalidad.
- Después, se procedió a cargar 16 jeringas con volúmenes correspondientes a los pesos de cada uno de los animales de experimentación.
- Las jeringas cargadas con el fármaco fueron colocadas en un cooler de tecnopor que contenía hielo para conservar la estabilidad y cadena de frío del fármaco y ser transportadas.
- Al finalizar, se desechó el material utilizado en la reconstitución de la BLM de acuerdo al plan de gestión de residuos sanitarios.



**Figura 21.** Reconstitución del Vial de Bleomicina.

### 3. TÉCNICAS Y MÉTODOS

#### 3.1. PROCEDIMIENTOS PARA LA INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR

El procedimiento se llevó a cabo en un ambiente de la clínica veterinaria de la UCSM. Por cual, los grupos de animales de experimentación fueron previamente pesados y trasladados en jaulas hacia dicho ambiente para posteriormente ser anestesiados. **(Figura 22)**

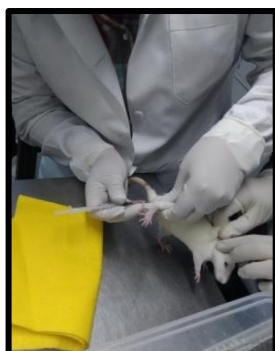


**Figura 22.** Traslado de los grupos de animales de experimentación a la Clínica veterinaria de UCSM.

### 3.2. PROCEDIMIENTO DE ANESTESIA

Para este procedimiento se utilizaron 2 anestésicos: Ketamina 100mg/mL (ketonal) y Xylacina 2g/100mL (xilagal) a una dosis de 95mg/Kg y 5mg/Kg de peso, respectivamente. Se cargaron en dos jeringas y luego se mezclaron ambas en una sola de 1mL. Después se administró por vía intramuscular (IM) de la siguiente manera: Se sujetó la pata trasera de la rata firmemente, se desinfectó el área con alcohol y luego se introdujo la aguja perpendicularmente a la piel del animal en los cuádriceps, zona frontal del muslo. No se inyectó en la masa muscular posterior ya que era posible dañar el nervio ciático. Después, se inyectó los anestésicos combinados en ambos muslos de las patas traseras, con el objetivo de distribuir la dosis y al retirar la aguja se masajeó suavemente dicha zona. **(Figura 23)**

Después de 3 a 5 minutos, se observó la pérdida del reflejo de enderezamiento y deglución. Logrando anestesiarse satisfactoriamente por separado a cada grupo de estudio, estos fueron colocados en una cámara de oxigenación, lo que permitió monitorear y mantener su temperatura, así como también suministrarles oxígeno.



**Figura 23.** Anestesia de los grupos de experimentación.

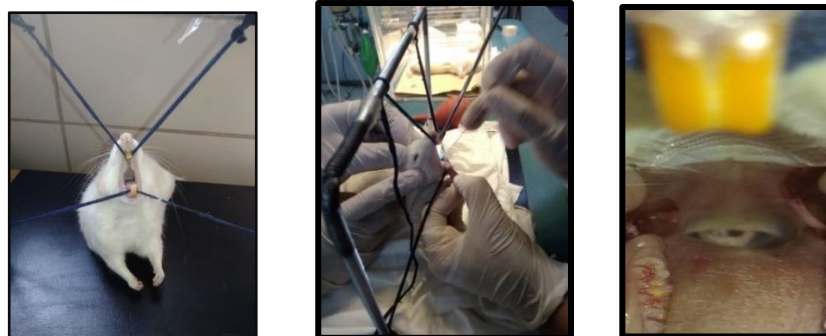


**Figura 24.** Cámara de oxigenación (Midwark VMS).

### 3.3. INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL DE BLM

Esta técnica fue realizada con los grupos de experimentación previamente anestesiados, de la siguiente manera:

- Primeramente, se colocó a la rata anestesiada en posición abdominal, con la mandíbula inferior sujeta por detrás de los incisivos y la mandíbula superior elevada, ambas con una cinta elástica. De esta manera, se permitió tener una mayor área de visualización de la boca del animal.
- Luego, la lengua del animal fue movida delicadamente hacia un costado fuera de la boca y con la ayuda de una linterna se pudo visualizar la epiglotis. **(Anexo 1)**
- Después, se introdujo lentamente un catéter N°22 llegando hacia el punto de bifurcación de las vías respiratorias y cuidadosamente accediendo a tráquea.
- Se hicieron leves movimientos giratorios del catéter con el objetivo de facilitar la intubación a través del interior de la tráquea. **(Figura 25)**
- Una vez intubado el animal, el catéter fue acoplado a la jeringa precargada y con la BLM y con aire para asegurar la administración de toda la dosis, luego se procedió a instilar empujando el embolo lentamente.<sup>73</sup>
- Finalizada la instilación intratraqueal, se tomó en cuenta que el animal no tuviera problemas de asfixia y su respiración se mantenga estable. Por último, se dejó reposar a la rata en su jaula hasta la recuperación de la anestesia.



**Figura 25.** Instilación Intratraqueal.

### 3.4. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO CON RSV A LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La administración del tratamiento se realizó por vía oral con la ayuda de una cánula de acero inoxidable. Para ello, se extrajo el contenido de 1 capsula de resveratrol de 500mg y se disolvió con 10mL de NaCl 0.9% en un beaker. Se administró un volumen a una dosis de 75mg/Kg ajustada al peso de cada rata. La administración del tratamiento se realizó diariamente en la mañana, por un período de 30 días con excepción de los fines de semana. **(Figura 26)**

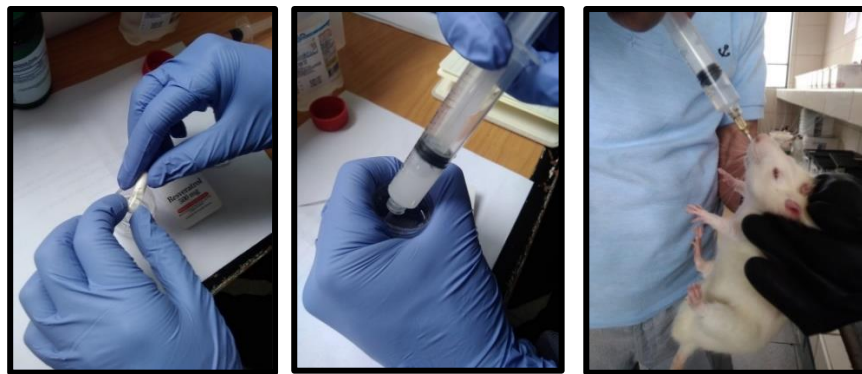
Los subgrupos control positivo, no recibieron tratamiento alguno; sin embargo, los subgrupos blancos, recibieron 2mL de NaCl 0.9% oralmente. El cálculo del ajuste dosis del tratamiento con RSV para una rata con un peso promedio de 0.300Kg, se realizó de la siguiente manera:

$$75\text{mg/Kg} \times 0.300\text{Kg} = 22.5\text{mg} \text{ ----> miligramos requeridos de RSV para 1 rata.}$$

$$500\text{mg}/10\text{mL} = 50\text{mg/mL} \text{ ----> solución de RSV disuelto en NaCl 0.9\%.}$$

$$\begin{array}{l} \text{Si} \quad 50\text{mg} \text{ -----} 1\text{mL} \\ \quad \quad 22.5\text{mg} \text{ -----} x \end{array}$$

$$x = 0.45\text{mL} \text{ ----> mililitros a tomar para obtener la dosis de RSV deseada, completado un volumen a 2mL con NaCl 0.9\%.}$$



**Figura 26.** Administración de Resveratrol como tratamiento.

### **3.5. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE EXPERIMENTACIÓN**

En primer lugar, se tomó una muestra de sangre basal a todos los animales de experimentación de los grupos de estudio, 5 días previos al día cero (instilación de BLM).

Al día siguiente, seguido de la inducción de la enfermedad pulmonar, se realizó la primera toma de muestra sanguínea en ambos grupos A y B, así como también los días 7 y 14, en el caso del grupo A, y los días 14 y 30, en el caso del grupo B.

## **4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO SANGUÍNEO POR EL MÉTODO DE TBARS**

### **4.1. FUNDAMENTO**

El método colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), es un método comúnmente usado y el más accesible. Su fundamento radica en la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA); que en condiciones ácidas y alta temperatura reacciona con el malondialdehído (MDA), dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno rojizo que es cuantificado a 532nm.<sup>30</sup>

El MDA, es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados y también durante el metabolismo de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas.<sup>74</sup> El daño celular originado por estrés oxidativo puede ser cuantificado fielmente por la determinación del MDA, que constituye un producto final de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares. Donde la concentración sérica de MDA, es directamente proporcional a los ácidos grasos



poliinsaturados oxidados y por lo tanto es un buen indicador de peroxidación lipídica.<sup>30</sup>

El MDA es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más cuantificado como marcador de estrés oxidativo en muchas condiciones patológicas.<sup>75,76</sup>

#### 4.2. PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO TBARS

Para la realización de esta técnica, el suero obtenido se procesó de la siguiente manera: En tubos de ensayo de 10mL, se añadieron 200uL de muestra (estándar o agua destilada en caso del blanco) y 1.5ml de TBA con 1.5mL de buffer acetato pH 3.5. Esta mezcla se incubo a 5°C en un baño de hielo por 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se dejaron los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se llevaron los tubos a 95°C en baño maría por 60 minutos y finalmente se los dejó 5 minutos a temperatura ambiente. (**Figura 27**)

Como último paso, se vertió el contenido a tubos falcon de 15mL, añadiendo 2.5mL butanol y 0.5mL de agua destilada a cada tubo; se centrifugaron los tubos a 4000rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante para ser añadido a los pocillos del platillo de lectura y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de micro placas a 532nm.<sup>42,78</sup> (**Anexo 2**)



**Figura 27.** Procedimiento en la formación del complejo MDA-TBA.

#### 4.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES Y CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la construcción de la gráfica de calibración, se utilizó como estándar tetraetoxipropano (TEP). Se añadió 20μL de TEP junto a 400μL de HCL 1N en una fiola de 100mL completando volumen con buffer acetato pH 3.5, de esta manera se obtuvo una concentración stock de 83.518μmol/L de malondialdehído.

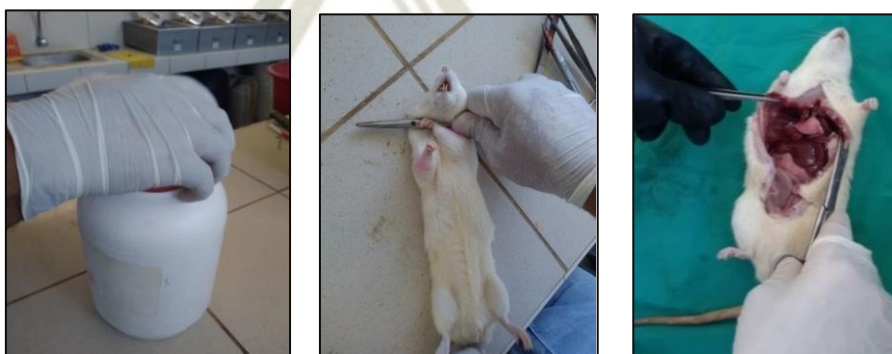
A partir de la solución stock, se prepararon 6 patrones de concentraciones: 0.3, 0.45, 0.6, 1.2, 2.4 y 4.8nmol/mL. Estos fueron procesados de la misma manera que las muestras, obteniendo así una gráfica de calibración para determinar las concentraciones de malondialdehído expresadas en  $\mu\text{mol/L}$ , de las respectivas muestras. **(Cuadro 10)**

$$\frac{20\mu\text{L TEP}}{100\text{mL Buffer Acetato}} = \frac{18.4\mu\text{g TEP}}{100\text{mL}} = \frac{835.18 \mu\text{mol}}{L} \times \frac{1}{10} = 83.518 \mu\text{mol/L}$$

## 5. BIOPSIA PULMONAR

Para realizar la biopsia pulmonar se tuvo que sacrificar a los animales de experimentación, mediante eutanasia.

- La eutanasia de los animales, se realizó utilizando cloroformo como sedativo y proceder con la dislocación cervical como un método físico; el cual es una técnica menos angustiada y estresante para el animal que otros procedimientos más complicados, como el uso de productos químicos.
- Teniendo el animal sedado, se le dispuso sobre una mesa de trabajo y se procedió a realizar una postura de sujeción manual con los dedos y colocando una varilla metálica en su cuello se tiró de la cola inmediatamente logrando dislocar las vértebras cervicales. **(Figura 28)**
- Finalmente, se procedió a la toma de biopsias pulmonares (lóbulo derecho), con instrumentos de cirugía, lavándolos en solución salina 0.9% y almacenándolos en tubos falcon de 50mL de capacidad, bien rotulados y conteniendo formalina al 4%, como fijador, para su conservación en posteriores análisis. **(Anexo 3 y 4)**



**Figura 28.** Eutanasia de los grupos de estudio.

### 5.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PULMONARES

Se procesaron 24 muestras de pulmón de los diferentes grupos de estudio, conservadas en tubos falcon que contenían formalina de la siguiente manera:

- a. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y seccionadas en diferentes zonas del lóbulo derecho para ser tratadas.
- b. Luego se deshidrataron las muestras, sumergiéndolas en sucesivos baños de solución de etanol con concentraciones crecientes de la siguiente manera:
  - Etanol al 70° ----- 5 horas
  - Etanol al 95° ----- 1 hora
  - Etanol al 100° (absoluto) -----1 hora
- c. Después, fueron sumergidas en xilol hasta por tres veces (media hora cada una).
- d. Por otro lado, se disolvió en una estufa, bloques discoidales de parafina, a una temperatura de 58°C, y la parafina diluida fue colocada en 3 recipientes diferentes con capacidad de 1000 a 1500cc. utilizados para sumergir las muestras, durante media hora en cada uno de ellos.
- e. Después se vertió la parafina diluida en diferentes moldes plásticos, conteniendo las muestras en su interior, ahí la parafina empezó a solidificar y formar bloques. En este procedimiento la parafina fue utilizada como “sustancia de inclusión” **(Figura 29)**
- f. Finalizada la inclusión mediante el uso de un micrótomo Minot, se cortaron las muestras y obtuvieron de 4 a 5 cortes seriados con un espesor de 5µm, dichos cortes fueron recogidos con pinzas.
- g. Finalmente, los cortes fueron extendidos en un baño de flotación para luego ser adheridos a un porta objetos.



**Figura 29.** Procesamiento de las muestras pulmonares.

## 6. TINCIONES HISTOLÓGICAS

### 6.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

Esta tinción es usada frecuente en estudios histológicos, y en citología. Se basa en dos etapas, la primera utilizando un colorante básico (hematoxilina) y la segunda utilizando un colorante ácido (eosina). La hematoxilina es oxidada y transformada al unirse con una sustancia mordiente, mediante el uso de sales metálicas (aluminio, hierro o cromo) formando un colorante activo; la hemateína, usado como colorante nuclear, que tiñe núcleos de color azul, negro, morado o violeta y al usarse con un colorante citoplasmático (eosina) permite observar, y diferenciar la morfología de la muestra analizada.<sup>31,79,80</sup>

El procedimiento de coloración fue el siguiente:

- 1) Se desparafinó la muestra agregándoles xilol por 4 minutos.
- 2) Luego Se Hidrataron en baños decrecientes de etanol
  - Etanol absoluto (100°) ----- 6 minutos
  - Etanol al 90° ----- 6 minutos
  - Etanol al 70°----- 6 minutos
  - agua destilada (2 veces) -----3 minutos (cada uno)
- 3) La primera tinción fue realizada agregando la solución de hematoxilina de Harris por 9 minutos.
- 4) Después, se lavaron las muestras con agua destilada (2 veces) por 2 minutos cada uno.

- 5) Se agregó alcohol ácido, ácido acético al 2% por 20 segundos para virar la tinción, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean los únicos que permanezcan teñidos.
- 6) Luego se lavaron las muestras con agua corriente por 4 minutos.
- 7) La segunda tinción fue realizada agregando Eosina por 5 minutos.
- 8) Después se deshidrataron las muestras en baños crecientes de etanol de la siguiente forma:
  - Etanol al 70° ----- 30 segundos
  - Etanol al 95°----- 30 segundos
  - Etanol absoluto (100°) -----2 min (2 veces)
- 9) Las muestras fueron aclaradas agregándoles xilol (dos veces, por 2 minutos cada una y se dejaron secar.
- 10) Finalmente, se realizó el montaje de las muestras para su posterior lectura y análisis.

## 6.2. TINCIÓN TRICÓMICO DE MASSON

Es una técnica colorimétrica especial que permite observar fibras colágeno tipo I del tejido conjuntivo. Comprende 3 colorantes, uno nuclear (hematoxilina) y 2 ácidos. El primero, Biebrich Scarlet, tiñe, citoplasma, músculo y colágeno. Por ello, se utiliza un segundo colorante, el ácido fosfotúngstico, que permiten que el colorante Biebrich difunda en las fibras colágeno, pero no en citoplasma. Esto se debe a que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, este también tiene numerosos grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de la anilina, que es el tinte del colágeno. Se observará la coloración roja en músculo, citoplasma, queratina y glóbulos rojos, coloración azul del colágeno y coloración azul o negra de los núcleos.<sup>31,80</sup>

### 6.2.1. EL FIJADOR ESPECIAL DE BOUIN

El Líquido de Bouin es una solución formada por (Formol, Ácido Pírico y Ácido Acético). Se usa para fijar tejidos blandos, glándulas y órganos reproductores. El formol es un fijador general y los otros dos componentes aportan menor dureza a la muestra fijada, y facilitan la fijación en zonas internas reduciendo la contracción del tejido.<sup>79,80</sup>

### 6.2.1.1. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Las muestras se sumergieron en un recipiente contenido con el fijador de Bouin, por un periodo de 4 horas, este tiempo fue adaptado por el tamaño y el tipo de tejido estudiado (la fijación promedio comprende entre 4 y 24 horas). Después de esto fue importante lavar hasta por 5 veces las muestras con Etanol al 70° para eliminar completamente el fijador.

El procedimiento de coloración fue el siguiente:

- 1) Se las desparafinó con xilol por 4 minutos.
- 2) Al día siguiente, se hidrataron en baños decrecientes de etanol
  - Etanol absoluto (100°) ----- 6 minutos.
  - Etanol al 90° -----6 minutos.
  - Etanol al 70° -----6 minutos.
  - agua destilada (2 veces) ----3 minutos (cada uno)
- 3) Se sumergió las muestras en hematoxilina por 6 min. Y fueron lavadas con agua destilada por 3 minutos.
- 4) Después se les agregó solución escarlata de Biebrich- fucsina acida por 10min y se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
- 5) Las muestras fueron sumergieron en ácido fosfotungstico, durante 10 min y se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
- 6) Luego se sumergieron las muestras en azul de anilina por 10 minutos y se lavaron con agua destilada.
- 7) Las muestras fueron lavadas con ácido acético al 1% y después con agua destilada.
- 8) Se las deshidrató, utilizando una serie creciente de alcoholes.
  - Etanol al 70° ----- 30 segundos
  - Etanol al 95° ----- 30 segundos
  - Etanol absoluto (100°) -----2 min (dos veces)
- 9) Se aclaró las muestras con xilol por 5 minutos.
- 10) Finalmente, las muestras se montaron para su análisis patológico.

## 7. ANÁLISIS DE DATOS

En los ensayos de determinación del MDA en suero sanguíneo y análisis de la escala de puntuación por el método de ashcroft, de las tinciones histológicas, se hallaron: promedio, varianza y desviación estándar. Para los procesos de significancia estadística se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de 1 y 2 vías, a una  $p < 0,05$ . Para analizar la variabilidad entre subgrupos de estudio, se realizó el test de Tukey. El programa estadístico empleado para el análisis de la base de datos y elaboración del registro fue Microsoft Excel 2018 y GraphPad Prism v. 6.0.





# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Se logró reproducir satisfactoriamente el modelo de IPF en ratas *wistar*, mediante una única instilación intra-traquealmente con BLM, durante un periodo experimental de 14 y 30 días; etapas consideradas como inflamatoria y fibrótica respectivamente, según el modelo animal. Una de las evidencias que se logró determinar para confirmar el daño causado por el tóxico fue: la cuantificación de un indicador de estrés oxidativo en suero sanguíneo, medido espectrofotométricamente en 4 tiempos durante la etapa experimental en ambos grupos de estudio, A y B. Considerando que el tóxico dañó el epitelio de revestimiento pulmonar; la concentración sanguínea de este radical libre fue aumentando progresivamente durante el curso de la enfermedad pulmonar inducida. Este fue, uno de los hechos que nos confirmó que la administración por vía intratraqueal de BLM fue exitosa.

Otro de los puntos clave para su confirmación en el modelo murino fueron: dos tinciones de cortes histológicos (tinción hematoxilina-eosina y tricómico de masson) tomados de los pulmones de las ratas, que nos revelaron las características UIP; un patrón histológico que se caracteriza principalmente por la excesiva deposición de matriz extracelular, reparación aberrante de tejido pulmonar, presencia de focos fibroblásticos, infiltración celular y colapso alveolar; los cuales están íntimamente relacionados con el desarrollo de IPF. Todas esas características fueron observadas y semi-cuantificadas mediante una escala que mide el grado de daño pulmonar (escala de puntuación del método de ashcroft). Igualmente, se realizaron observaciones y comparaciones macroscópicas de los pulmones extraídos de los animales experimentales, después de su sacrificio; encontrándose grandes diferencias significativas entre los subgrupos experimentales.

Finalmente, se apreciaron cambios en los pesos corporales, de los animales de experimentación, durante los días 14 y 30 de experimentación, en comparación con los subgrupos experimentales. No se registró ningún caso de mortalidad de los animales durante el trabajo de investigación.

Todos estos resultados y rasgos descritos previamente, del presente trabajo de investigación, se explicarán detalladamente en los siguientes puntos.

## 2. EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LOS PESOS CORPORALES DE LAS RATAS DURANTE 14 DÍAS DE POST-INDUCCIÓN DE IPF – GRUPO A

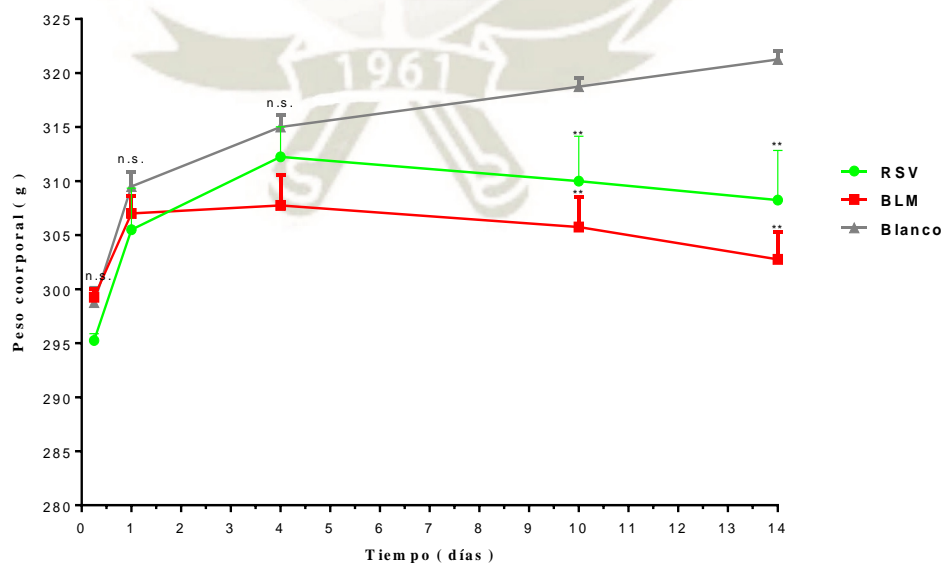
La evolución de pesos de los animales de experimentación del grupo "A" variaron en el tiempo debido al tipo de tratamiento que recibieron cada subgrupo. (Figura 30)

No hubo variaciones de peso en el caso del subgrupo blanco, debido a que solo recibieron solución salina; sin embargo, se determinó un descenso de peso en los subgrupos BLM y RSV, en los días 10 y 14, por lo que podemos inferir que fueron debidos a los efectos citotóxicos de la BLM en el desarrollo de fibrosis pulmonar, por el contrario, la administración de RSV atenuó ligeramente tal descenso.

**Cuadro 8.** Promedio de pesos del grupo A.

	día basal	día 1	día 4	día 10	día 14
<b>Subgrupo tratamiento (resveratrol)</b>	295.25	305.50	309.75	312.25	308.25
Desviación estándar	1.26	7.68	5.56	8.23	9.16
<b>Subgrupo control positivo (bleomicina)</b>	299.25	307.00	307.75	305.75	302.75
Desviación estándar	1.50	3.16	5.68	5.56	4.99
<b>Subgrupo blanco</b>	298.75	309.50	315.00	318.75	321.25
Desviación estándar	2.75	2.65	2.16	1.50	1.50

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 30.** Evolución de pesos durante 14 post-inducción de IPF.

### 3. EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LOS PESOS CORPORALES DE LAS RATAS DURANTE 30 DÍAS DE POST-INDUCCIÓN DE IPF – GRUPO B

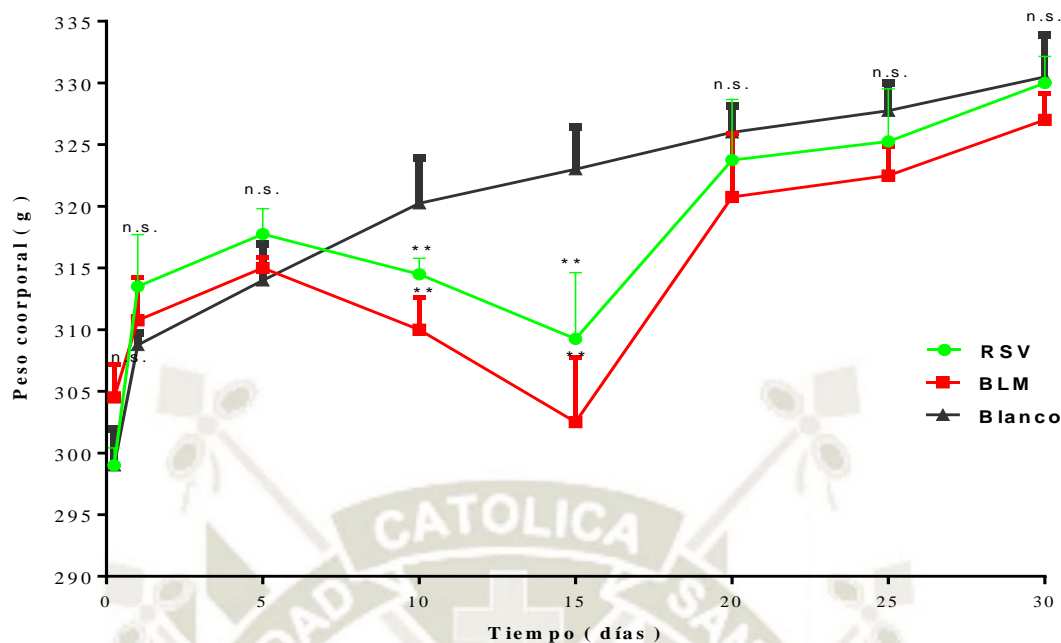
La evolución de pesos de los animales de experimentación del grupo "B" variaron en el tiempo debido al tipo de tratamiento que recibieron cada subgrupo. **(Figura 31)**

No hubo variaciones de peso en el caso del subgrupo blanco, debido a que su tratamiento constó solamente en la administración de solución salina; sin embargo, se determinó una notable pérdida de pesos en los subgrupos BLM y RSV aproximadamente del día 10 y 15, los cuales fueron regularizándose hasta el día 30. Parece ser que los efectos tóxicos de la BLM y el desarrollo de fibrosis pulmonar, ejercieron un efecto negativo en los pesos corporales de las ratas, sobre todo en los primeros días post-inducción de la enfermedad, aunque la administración de RSV marcó una ligera diferencia, como se observa en el gráfico anterior. **(Cuadro 9)**

**Cuadro 9.** Promedio de pesos del grupo B.

	día basal	día 1	día 5	día 10	día 15	día 20	día 25	día 30
<b>Subgrupo tratamiento (resveratrol)</b>	299.00	313.5	317.75	314.50	309.25	323.75	326.25	330.00
Desviación estándar	1.41	4.20	2.10	1.29	5.38	4.92	4.27	2.16
<b>Subgrupo control positivo (bleomicina)</b>	304.50	310.75	315.00	310.00	302.50	320.75	322.50	327.00
Desviación estándar	2.64	3.50	0.82	2.58	5.26	5.12	2.38	2.16
<b>Subgrupo blanco</b>	299.00	308.75	314.00	320.25	323.00	326.00	327.75	330.50
Desviación estándar	2.94	0.96	2.94	3.69	3.46	2.16	2.22	3.42

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 31.** Evolución de pesos durante 30 días de post-inducción de IPF.

Soo Nam Kim y col. en el 2010, realizaron una investigación sobre en el mismo modelo animal de BLM, en el que demostraron una disminución en los pesos corporales especialmente en la 1ra. semana de exposición a este toxico, pero que se revierte posteriormente.<sup>36</sup> En los **ANEXOS 8 y 9**, se encuentran todos los pesos pertenecientes a los animales de experimentación de los grupos A y B y también los análisis estadísticos respectivos.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO EN SUERO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN POR EL MÉTODO DE TBARS

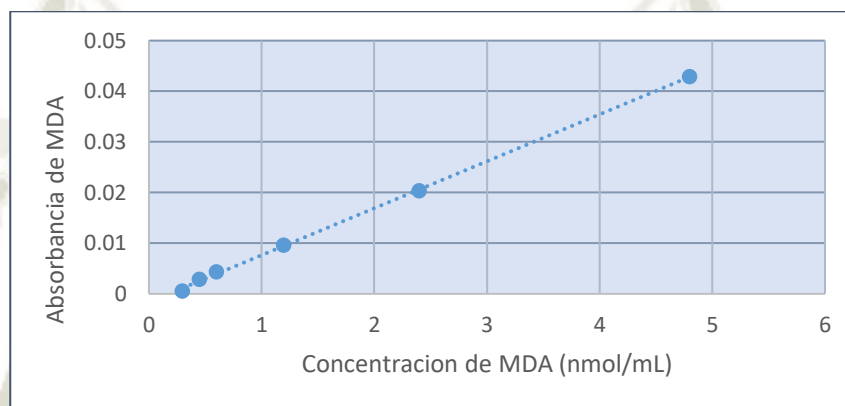
##### 4.1. GRÁFICA DE CALIBRACIÓN DEL ENSAYO DE TBARS PARA LA DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

La hidrólisis del tetraetoxipropano (TEP), utilizado como precursor del estándar de MDA reaccionó proporcionalmente con el TBA en la formación del complejo rojizo (MDA-TBA), hecho evidenciado por la obtención de una gráfica de calibración con 6 patrones de concentraciones distintas y un coeficiente de correlación aceptable de  $R^2:0.9994$ ; el cual nos representa una alta linealidad entre las concentraciones y absorbancias de los patrones preparados para la determinación de MDA. (**Figura 32**)

**Cuadro 10.** Preparación de los patrones de MDA.

Concentración (μmol/L)	Volumen de stock (mL)	Volumen final (mL)
0.30	0.18	50.00
0.45	0.27	50.00
0.60	0.36	50.00
1.20	0.72	50.00
2.40	1.44	50.00
4.80	2.87	50.00

*Fuente: Elaboración propia.*



*Fuente: Elaboración propia.*

**Ecuación de regresión lineal:**  $Y=0.0093X-0.0016$

**Coefficiente de correlación:**  $R^2: 0.9994$

**Figura 32.** Gráfica de calibración de MDA

Durante la cuantificación de las muestras biológicas tomadas de los animales de experimentación, la concentración mínima hallada fue 1.122μmol/L y la máxima 3.342μmol/L, dichos valores se ubicaron dentro de la gráfica de calibración construida con los patrones de MDA. En los **ANEXOS 5, 6 Y 7** se encuentran los valores de absorbancia medidos de los patrones de MDA y las muestras pertenecientes al grupo A y B, respectivamente.

#### **4.2. EVALUACIÓN DE LOS VALORES BASALES DE MDA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTACIÓN A Y B**

Previamente a la inducción de la enfermedad con el tóxico, se extrajo suero sanguíneo procedentes de todos los animales de experimentación de ambos grupos (A y B) para cuantificar espectrofotométricamente los niveles basales de MDA y tomarlos como un punto inicial de referencia en la inducción y evolución de la

enfermedad pulmonar inducida por BLM, como un marcador de estrés oxidativo.

(Cuadro 11 y 12)

**Cuadro 11.** Valores de MDA basales en suero del grupo A ( $\mu\text{mol/L}$ ).

Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco
1.282	1.229	1.265
1.161	1.181	1.287
1.302	1.282	1.244
1.171	1.261	1.190
$\bar{x} \pm DS = 1.229 \pm 0.073$	$\bar{x} \pm DS = 1.238 \pm 0.044$	$\bar{x} \pm DS = 1.247 \pm 0.042$

*Fuente: Elaboración propia.*

**Cuadro 12.** Valores de MDA basales en suero del grupo B ( $\mu\text{mol/L}$ ).

Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco
1.122	1.177	1.255
1.310	1.293	1.303
1.221	1.152	1.244
1.284	1.322	1.269
$\bar{x} \pm DS = 1.234 \pm 0.084$	$\bar{x} \pm DS = 1.236 \pm 0.084$	$\bar{x} \pm DS = 1.268 \pm 0.025$

*Fuente: Elaboración propia.*

Con el objetivo de demostrar que todos los animales del estudio iban a iniciar la etapa experimental en las mismas condiciones, con niveles de MDA en suero sanguíneo similares; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre todos ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 13.** ANOVA de 1 vía de los valores basales en suero de MDA de los grupos A Y B.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.039	0.999	2.773

*Fuente: Elaboración propia.*

$H_0$ : Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

$H_1$ : Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que el valor de  $p=0.999$  es mayor a 0.05; nos demuestra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA basales en suero de los animales de experimentación pertenecientes a los grupos de

estudio A y B; por lo que, se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

Los animales de experimentación compartieron concentraciones basales de MDA en suero, similares en la etapa de pre-inducción de la enfermedad pulmonar. En el **ANEXOS 10**, se encuentran datos adicionales del ANOVA de los niveles de MDA basales.

### 4.3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: DÍAS BASALES Y DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) PERTENECIENTES AL GRUPO A

#### 4.3.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO TRATAMIENTO CON RSV:

La administración de una solución de 75mg/Kg de peso de RSV a los animales de experimentación, se realizó diariamente por vía oral, un día siguiente de la instilación de BLM.

Durante los 14 días de tratamiento con RSV, se observó un incremento gradual de los niveles de MDA en suero sanguíneo de los animales, (**Figura 33**) que fue ascendiendo desde un promedio basal de 1.229 $\mu$ mol/L hasta llegar a una concentración media de 1.878 $\mu$ mol/L del día 14 de experimentación.

Podemos inferir que, la BLM ejerció cierto grado de estrés oxidativo, hecho que fue constatado por la cuantificación de MDA en suero sanguíneo y que fue aumentado tras un curso de 14 días de post-inducción de fibrosis pulmonar.

**Cuadro 14.** Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento ( $\mu$ mol/L).

	día basal	día 1	día 7	día 14
<b>Subgrupo tratamiento (resveratrol)</b>	1.282	1.465	1.657	1.843
	1.161	1.513	1.662	1.881
	1.302	1.433	1.667	1.895
	1.171	1.573	1.646	1.891
$\bar{x} \pm DS$	<b>1.229 <math>\pm</math> 0.073</b>	<b>1.496 <math>\pm</math> 0.061</b>	<b>1.658 <math>\pm</math> 0.009</b>	<b>1.878 <math>\pm</math> 0.024</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Para determinar si existe una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 15.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	122.937	2.832 x10 <sup>-9</sup>	3.490

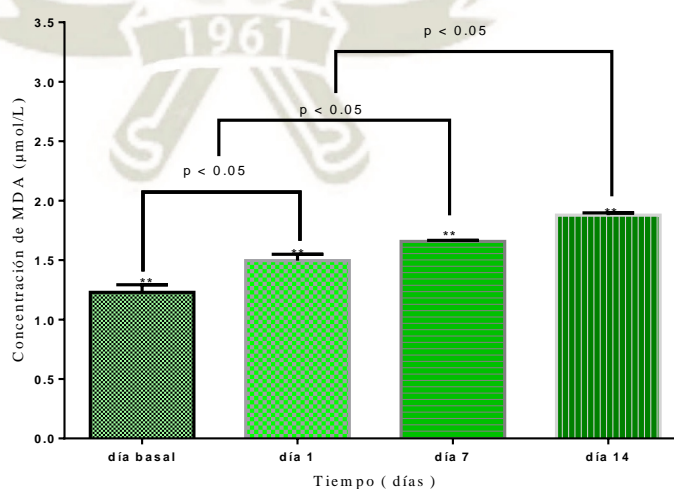
*Fuente: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

H<sub>1</sub>: Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que el valor de  $p=2.832 \times 10^{-9}$  es menor a 0.05; nos demuestra que, si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa a un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ .

Por lo tanto, existe al menos una diferencia entre los niveles basales de MDA y el de los días de tratamiento 1,7 y 14; para ello se realizó un test tukey para confirmar tal análisis (**Cuadro 16**).



**Figura 33.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento.



**Cuadro 16.** Test de tukey del subgrupo tratamiento.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
día basal - día 1	0.267	0.103	Si hay diferencia
día basal - día 7	0.429		Si hay diferencia
día basal - día 14	0.649		Si hay diferencia
día 1 - día 7	0.162		Si hay diferencia
día 1 - día 14	0.381		Si hay diferencia
día 7 - día 14	0.220		Si hay diferencia

*Fuente:* Elaboración propia.

El test de tukey nos demuestra que, si existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días de tratamiento 1,7 y 14 con RSV, a un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$ .

#### 4.3.2. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO CONTROL POSITIVO CON BLM:

La instilación de intratraqueal se realizó con una dosis única de 2.0mg/Kg de peso de BLM a los animales de experimentación el día 0.

Durante los 14 días de la etapa experimental, los animales pertenecientes a este subgrupo no recibieron tratamiento alguno. Así mismo, se observó un incremento gradual significativo de los niveles de MDA en suero sanguíneo, (**Figura 34**) que fue ascendiendo desde un promedio basal de 1.238 $\mu$ mol/L hasta llegar a una concentración media de 2.214 $\mu$ mol/L del día 14 de experimentación. Podemos inferir que, debido a los efectos citotóxicos de la BLM, se produjo estrés oxidativo, hecho que fue constatado por la cuantificación de MDA en suero sanguíneo y que fue aumentando tras un curso de 14 días de post-inducción de fibrosis pulmonar.

**Cuadro 17.** Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo control positivo ( $\mu$ mol/L).

	día basal	día 1	día 7	día 14
<b>Subgrupo control positivo</b>	1.229	1.497	1.705	2.162
	1.181	1.491	1.682	2.167
	1.282	1.424	1.689	2.171
	1.261	1.568	1.691	2.357
$\bar{x} \pm DS$	<b>1.238 <math>\pm</math> 0.044</b>	<b>1.495 <math>\pm</math> 0.060</b>	<b>1.692 <math>\pm</math> 0.010</b>	<b>2.214 <math>\pm</math> 0.095</b>

*Fuente:* Elaboración propia.

Para determinar la existencia de una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 18.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo control positivo.

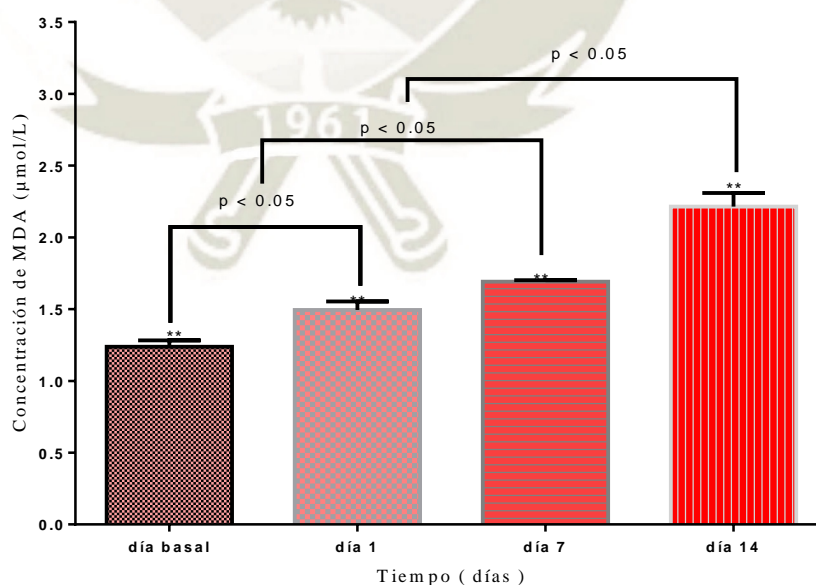
Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	187.714	$2.398 \times 10^{-10}$	3.490

*Fuente: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

H<sub>1</sub>: Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que el valor de  $p=2.398 \times 10^{-10}$  es menor a 0.05; nos demuestra que si existe una gran diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa a un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ . Por lo tanto, existe al menos una diferencia entre los niveles de MDA basales y los días de tratamiento 1,7 y 14; para ello se realizó un test de tukey que confirmó este análisis (**Cuadro 19**).



**Figura 34.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo control positivo.

**Cuadro 19.** Test de tukey del subgrupo control positivo.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
día basal - día 1	0.257	0.127	Si hay diferencia
día basal - día 7	0.454		Si hay diferencia
día basal - día 14	0.976		Si hay diferencia
día 1 - día 7	0.197		Si hay diferencia
día 1 - día 14	0.719		Si hay diferencia
día 7 - día 14	0.522		Si hay diferencia

*Fuente:* Elaboración propia.

El test de tukey nos demuestra que, si existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días 1,7 y 14 post-inducidos con BLM, a un nivel de confianza de  $\alpha= 0.05$ .

#### 4.3.3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO BLANCO:

La administración oral de solución salina al 0.9% a los animales de experimentación, se realizó diariamente y por 14 días.

Durante la etapa experimental, los animales pertenecientes a este subgrupo no recibieron tratamiento alguno. Así mismo, no se observó un incremento significativo de los niveles de MDA en suero sanguíneo con respecto a las muestras basales; (**Figura 35**) los cuales tuvieron un promedio inicial de 1.247 $\mu$ mol/L variando ligeramente hasta una media de 1.291 $\mu$ mol/L del día 14 de experimentación.

Teniendo en cuenta ello, la solución salina no influyó en los niveles de MDA en suero ni en el desarrollo de la enfermedad pulmonar. Por lo que concluimos que, los animales de experimentación pertenecientes a este subgrupo no presentaron indicios de estrés oxidativo durante los 14 días de experimentación.

**Cuadro 20.** Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo blanco ( $\mu\text{mol/L}$ ).

	día basal	día 1	día 7	día 14
<b>Subgrupo blanco</b>	1.265	1.295	1.300	1.299
	1.287	1.321	1.272	1.307
	1.244	1.293	1.329	1.293
	1.190	1.240	1.186	1.266
$\bar{x} \pm \text{DS}$	<b>1.247 <math>\pm</math> 0.042</b>	<b>1.287 <math>\pm</math> 0.0334</b>	<b>1.272 <math>\pm</math> 0.062</b>	<b>1.291 <math>\pm</math> 0.018</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Para determinar la existencia de una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 21.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo blanco.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.014	0.166	3.490

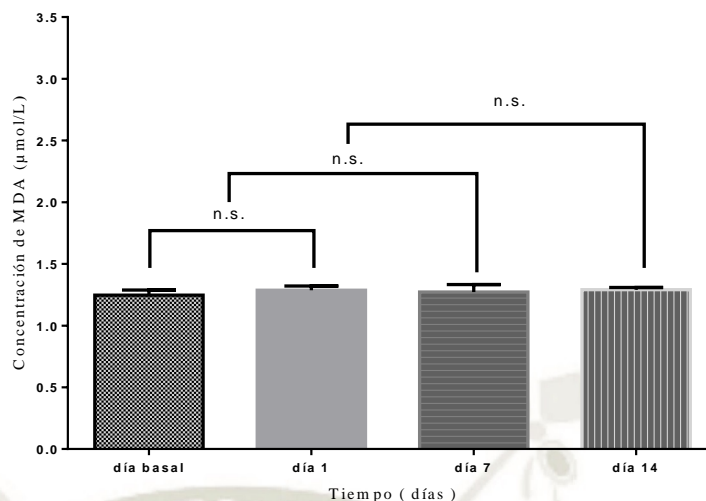
*Fuente: Elaboración propia.*

$H_0$ : Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

$H_1$ : Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que, el valor de  $p=0.166$  es mayor a  $0.05$ ; nos demuestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula a un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ .

Por lo tanto, no existe diferencia entre los niveles de MDA basales y los días de tratamiento 1,7 y 14. (**Cuadro N° 22**).



**Figura 35.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo blanco.

**Cuadro 22.** Test de tukey del subgrupo blanco.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
Día basal - Día 1	0.041	0.0970	No hay diferencia
Día basal - Día 7	0.025		No hay diferencia
Día basal - Día 14	0.045		No hay diferencia
Día 1 - Día 7	0.016		No hay diferencia
Día 1 - Día 14	0.004		No hay diferencia
Día 7 - Día 14	0.020		No hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey nos demuestra que no existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días 1,7 y 14 experimentales, a un nivel de confianza de  $\alpha= 0.05$ .

#### 4.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: DÍAS BASALES Y DIAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30) PERTENECIENTES AL GRUPO B

##### 4.4.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO TRATAMIENTO CON RSV:

La administración de una solución de 75mg/Kg de peso de RSV a los animales de experimentación, se realizó diariamente por vía oral, un día después de la instilación de BLM.

Durante los 30 días de tratamiento con RSV se observó un incremento gradual de los niveles de MDA en suero sanguíneo, (**Figura 36**) que fue

ascendiendo desde un promedio basal de 1.234 $\mu$ mol/L hasta llegar a una concentración media de 2.361  $\mu$ mol/L del día 30 de experimentación.

Podemos inferir que, la BLM ejerció estrés oxidativo, hecho que fue constatado por la cuantificación de MDA en suero sanguíneo y que fue aumentado tras un curso de 30 días de post-inducción de fibrosis pulmonar.

(Cuadro 23)

**Cuadro 23.** Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento ( $\mu$ mol/L).

	día basal	día 1	día 14	día 30
<b>Subgrupo tratamiento (RSV)</b>	1.122	1.587	1.882	2.344
	1.310	1.425	1.902	2.255
	1.221	1.566	1.819	2.447
	1.284	1.538	1.824	2.396
$\bar{x} \pm DS$	<b>1.234 <math>\pm</math> 0.836</b>	<b>1.529 <math>\pm</math> 0.072</b>	<b>1.857 <math>\pm</math> 0.042</b>	<b>2.361 <math>\pm</math> 0.082</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Para determinar si existe una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 24.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo tratamiento.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	180.676	3.000 x10 <sup>-10</sup>	3.490

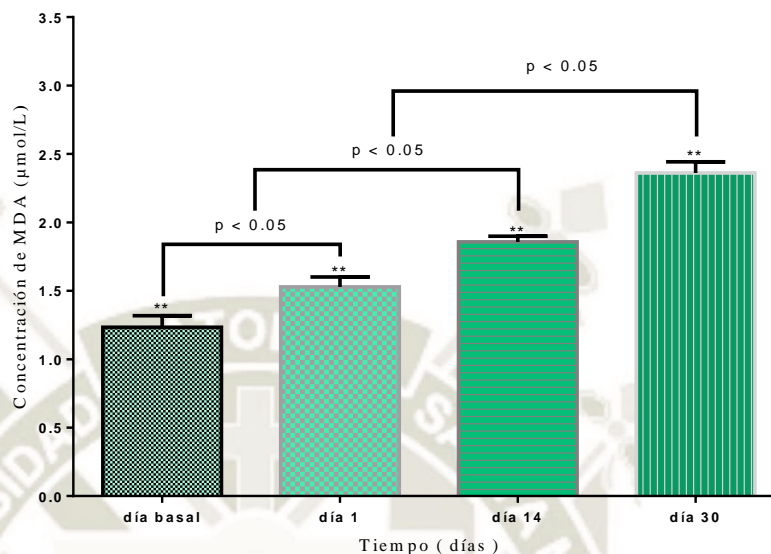
*Fuente: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Hipótesis nula = No existe diferencia significativa; p > 0.05

H<sub>1</sub>: Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa; p $\leq$  0.05

Dado que el valor de p=3.00 x10<sup>-10</sup> es menor a 0.05; nos demuestra que, si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa a un nivel de significancia de  $\alpha$ = 0.05.

Por lo tanto, existe al menos una diferencia entre los niveles de MDA basales y los días de tratamiento 1,14 y 30; para ello se realizó un test de tukey para confirmar este análisis (**Cuadro N° 25**).



**Figura 36.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo resveratrol.

**Cuadro 25.** Test de tukey del subgrupo tratamiento.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
día basal - día 1	0.295	0.151	Si hay diferencia
día basal - día 14	0.622		Si hay diferencia
día basal - día 30	1.126		Si hay diferencia
día 1 - día 14	0.328		Si hay diferencia
día 1 - día 30	0.831		Si hay diferencia
día 14 - día 30	0.504		Si hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey nos demuestra que, si existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días de tratamiento 1,14 y 30 con RSV, a un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$ .

#### 4.4.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUBGRUPO CONTROL POSITIVO CON BLM:

La instilación de intratraqueal de 2.0mg/Kg de peso de BLM a los animales de experimentación, se realizó únicamente el día 0.

Durante los 30 días de la etapa experimental, los animales pertenecientes a este subgrupo no recibieron tratamiento alguno. Así mismo, se observó un gran incremento gradual de los niveles de MDA en suero sanguíneo, (**Figura 37**) que fue ascendiendo desde un promedio basal de  $1.236\mu\text{mol/L}$  hasta llegar a una concentración media de  $3.103\mu\text{mol/L}$  del día 30 de experimentación.

Podemos inferir que, la BLM ejerció estrés oxidativo, hecho que fue constatado por la cuantificación de MDA en suero sanguíneo y que fue aumentado tras un curso de 30 días de post-inducción de fibrosis pulmonar.

**Cuadro 26.** Niveles de MDA del subgrupo control positivo ( $\mu\text{mol/L}$ ).

	día basal	día 1	día 14	día 30
<b>Subgrupo control positivo (BLM)</b>	1.177	1.411	2.288	3.140
	1.293	1.514	2.399	3.342
	1.152	1.573	2.132	2.958
	1.322	1.472	2.330	2.972
$\bar{x} \pm DS$	<b><math>1.236 \pm 0.084</math></b>	<b><math>1.492 \pm 0.068</math></b>	<b><math>2.287 \pm 0.113</math></b>	<b><math>3.103 \pm 0.180</math></b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Para determinar la existencia de una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 27.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo control positivo.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	201.198	$1.596 \times 10^{-10}$	3.490

*Fuente: Elaboración propia.*

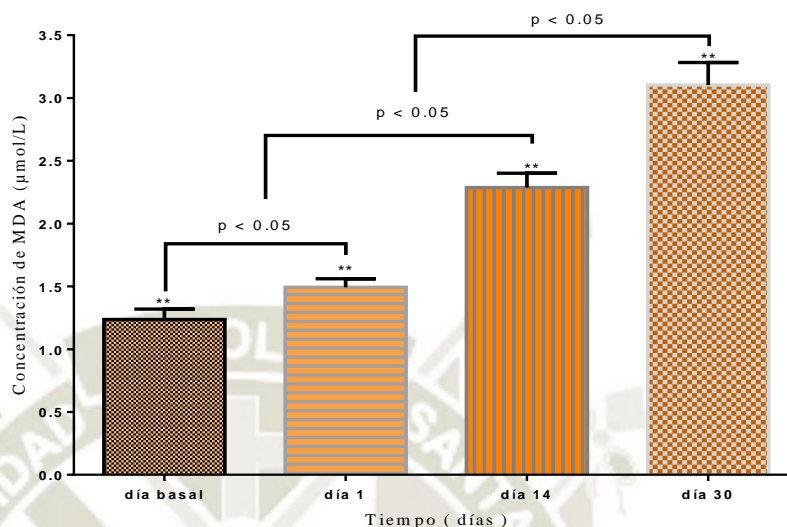
$H_0$ : Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

$H_1$ : Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que el valor de  $p=1.596 \times 10^{-10}$  es menor a 0.05; nos demuestra que si existe una gran diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa a un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ .



Por lo tanto, existe al menos una diferencia entre los niveles de MDA basales y los días de tratamiento 1,14 y 30; para ello se realizó un test tukey para confirmar tal análisis (**Cuadro 28**).



**Figura 37.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo bleomicina.

**Cuadro 28.** Test de tukey del subgrupo control positivo.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
día basal - día 1	0.257	0.250	Si hay diferencia
día basal - día 14	1.052		Si hay diferencia
día basal - día 30	1.867		Si hay diferencia
día 1 - día 14	0.795		Si hay diferencia
día 1 - día 30	1.611		Si hay diferencia
día 14 - día 30	0.816		Si hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey nos demuestra que, si existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días 1,14 y 30 post-inducidos con BLM, a un nivel de confianza de  $\alpha= 0.05$ .

#### 4.4.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA DEL SUB GRUPO BLANCO

La administración oral de solución salina al 0.9% a los animales de experimentación, se realizó diariamente y por 30 días.

Durante la etapa experimental, los animales pertenecientes a este subgrupo no recibieron tratamiento alguno. Así mismo, no se observó un incremento significativo de los niveles de MDA en suero sanguíneo con respecto a las

muestras basales; (**Figura 38**) los cuales tuvieron un promedio inicial de 1.268 $\mu$ mol/L variando ligeramente hasta una media de 1.311 $\mu$ mol/L del día 30 de experimentación.

Teniendo en cuenta ello, la solución salina no influyó en los niveles de MDA en suero ni en el desarrollo de la enfermedad pulmonar. Por lo que concluimos que, los animales de experimentación pertenecientes a este subgrupo no presentaron indicios de estrés oxidativo durante los 30 días de experimentación.

**Cuadro 29.** Cuadro resumen de los niveles de MDA del subgrupo blanco ( $\mu$ mol/L).

	día basal	día 1	día 14	día 30
<b>Subgrupo blanco</b>	1.255	1.315	1.309	1.293
	1.303	1.285	1.299	1.305
	1.244	1.295	1.325	1.329
	1.269	1.316	1.295	1.318
$\bar{x} \pm DS$	<b>1.268 <math>\pm</math> 0.025</b>	<b>1.303 <math>\pm</math> 0.015</b>	<b>1.307 <math>\pm</math> 0.014</b>	<b>1.311 <math>\pm</math> 0.016</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Para determinar la existencia de una diferencia significativa entre los valores de MDA cuantificados durante la pre y post-inducción de la enfermedad; se realizó un análisis de varianza de 1 vía entre ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 30.** ANOVA de 1 vía de los niveles de MDA del subgrupo blanco.

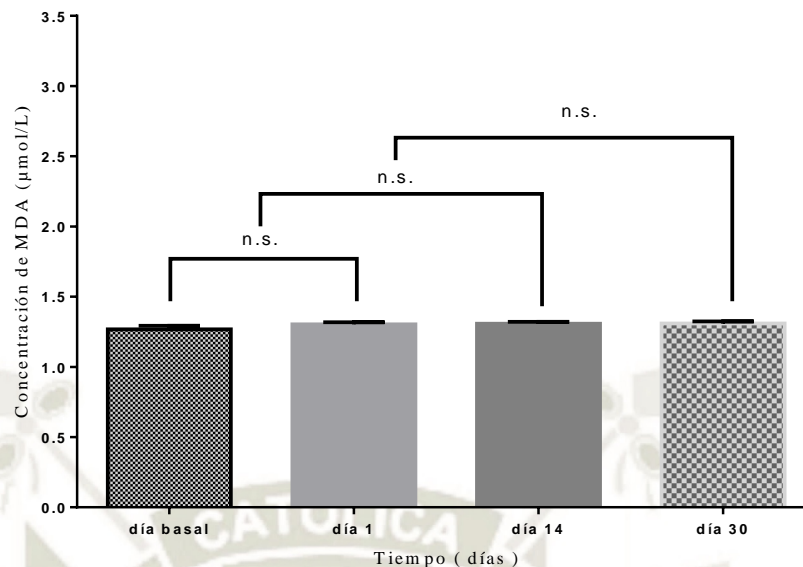
Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.791	0.051	3.490

*Fuente: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

H<sub>1</sub>: Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Dado que el valor de  $p=0.051$  es mayor a 0.05; nos demuestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de MDA en suero durante la pre y post-inducción de la enfermedad; por lo que, se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula a un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ . Por lo tanto, no existe una diferencia entre los niveles de MDA basales y los días 1,14 y 30 experimentales (**Cuadro 30**)



**Figura 38.** Comparación de los niveles de MDA del subgrupo blanco.

**Cuadro 31.** Test de tukey del subgrupo blanco.

Contraste	Diferencia entre medias	Límite	Resultado
día basal - día 1	0.034	0.037	No hay diferencia
día basal - día 14	0.035		No hay diferencia
día basal - día 30	0.033		No hay diferencia
día 1 - día 14	0.005		No hay diferencia
día 1 - día 30	0.009		No hay diferencia
día 14 - día 30	0.004		No hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey nos demuestra que no existe una diferencia significativa entre los niveles de MDA del día basal y los días 1,14 y 30 experimentales, a un nivel de confianza de  $\alpha= 0.05$ .

#### 4.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: MUESTRAS BASALES, DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) Y SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO A

Con el objetivo de establecer una diferencia de los niveles de MDA en suero sanguíneo de los subgrupos pertenecientes al grupo "A" y días experimentales (día basal, 1,7 y 14), (**Cuadro 32**) se realizó un análisis de varianza de dos vías, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 32.** Cuadro resumen de los niveles de MDA pertenecientes al grupo A. ( $\mu\text{mol/L}$ )

	día basal	día 1	día 7	día 14
<b>Subgrupo tratamiento (RSV)</b>	1.282	1.465	1.657	1.843
	1.161	1.513	1.662	1.881
	1.302	1.433	1.667	1.895
	1.171	1.573	1.646	1.891
<b>Subgrupo control positivo (BLM)</b>	1.229	1.497	1.705	2.162
	1.181	1.491	1.682	2.167
	1.282	1.424	1.689	2.171
	1.261	1.568	1.691	2.357
<b>Subgrupo blanco</b>	1.159	1.295	1.300	1.299
	1.287	1.321	1.272	1.307
	1.244	1.293	1.329	1.293
	1.190	1.240	1.186	1.266

*Fuente: Elaboración propia.*

**Cuadro 33.** ANOVA de 2 vías de los niveles de MDA del grupo A.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Subgrupos experimentales	244.918	$1.092 \times 10^{-21}$	3.259
Días experimentales	244.215	$5.617 \times 10^{-24}$	2.866
Interacción	58.232	$4.629 \times 10^{-17}$	2.364

*Fuente: Elaboración propia.*

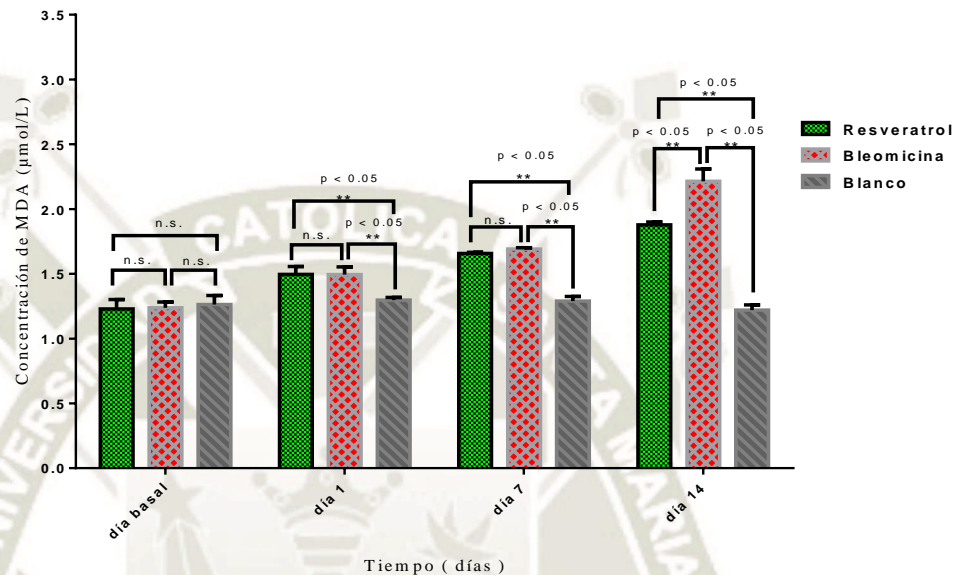
$H_0$ : Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

$H_1$ : Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Realizado el análisis de varianza, se obtuvo un valor de  $p = 1.092 \times 10^{-21}$  menor a 0.05, por lo que aceptamos la hipótesis alternativa y rechazamos la hipótesis nula; por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos experimentales: tratamiento, control positivo y blanco. De tal manera, existe una gran diferencia significativa entre los días de experimentación de cada subgrupo; estos resultados nos demuestran que los niveles de MDA son totalmente distintos entre ellos, durante los 14 primeros días de la etapa experimental.

Como se puede observar en la **Figura 39**, los niveles de MDA en suero sanguíneo desde la inducción de fibrosis pulmonar, fueron aumentando gradualmente tras 14 días; llegando a un promedio de 1.238 a 2.214 y de 1.229 a 1.878  $\mu\text{mol/L}$  de los subgrupos control positivo y tratamiento, respectivamente.

Se determinó también, una diferencia entre el subgrupo que recibió como tratamiento una dosis diaria de 75mg/Kg de RSV en contraste con el subgrupo control positivo, que recibió 2.0mg/Kg de BLM y ningún tratamiento; lo que nos demuestra cierto efecto pneumoprotector a nivel pulmonar de este componente al disminuir la expresión del MDA como un indicador de estrés oxidativo.



**Figura 39.** Comparación de los niveles de MDA del grupo A.

La BLM al tener contacto con las células epiteliales del parénquima pulmonar, ejerce su efecto citotóxico causando daño y muerte celular por escisión de las cadenas de ADN, necrosis y expresión de radicales libres que causan inflamación pulmonar. Los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del RSV tuvieron influencia en esta etapa experimental, protagonizando un efecto pneumoprotector en la inducción de IPF del modelo murino, en la cual se desarrolla una fase inflamatoria durante las dos primeras semanas de la instilación intratraqueal de BLM.

#### 4.6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE MDA EN SUERO DE: MUESTRAS BASALES, DÍAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30) Y SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO B

Culminado los 30 días de la etapa experimental, se analizó los niveles de MDA en suero sanguíneo de los 3 subgrupos, (**Cuadro 34**) para evaluar la evolución de este RL durante la fase fibrótica, que se desarrolla en el modelo animal de fibrosis pulmonar; obteniendo los siguientes resultados mediante un análisis de varianza de dos vías.

**Cuadro 34.** Cuadro resumen de los niveles de MDA pertenecientes al grupo B ( $\mu\text{mol/L}$ ).

	día basal	día 1	día 14	día 30
<b>Subgrupo tratamiento (RSV)</b>	1.122	1.587	1.882	2.344
	1.310	1.425	1.902	2.255
	1.221	1.566	1.819	2.447
	1.284	1.538	1.824	2.396
<b>Subgrupo control positivo (BLM)</b>	1.177	1.411	2.288	3.140
	1.293	1.514	2.399	3.342
	1.152	1.573	2.132	2.958
	1.322	1.472	2.330	2.972
<b>Subgrupo blanco</b>	1.255	1.315	1.309	1.293
	1.166	1.285	1.299	1.305
	1.244	1.295	1.325	1.329
	1.269	1.316	1.295	1.318

*Fuente: Elaboración propia.*

**Cuadro 35.** ANOVA de 2 vías de los niveles de MDA del grupo B.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Subgrupos experimentales	334.938	$5.449 \times 10^{-24}$	3.259
Días experimentales	364.608	$5.515 \times 10^{-27}$	2.866
Interacción	101.414	$4.777 \times 10^{-21}$	2.364

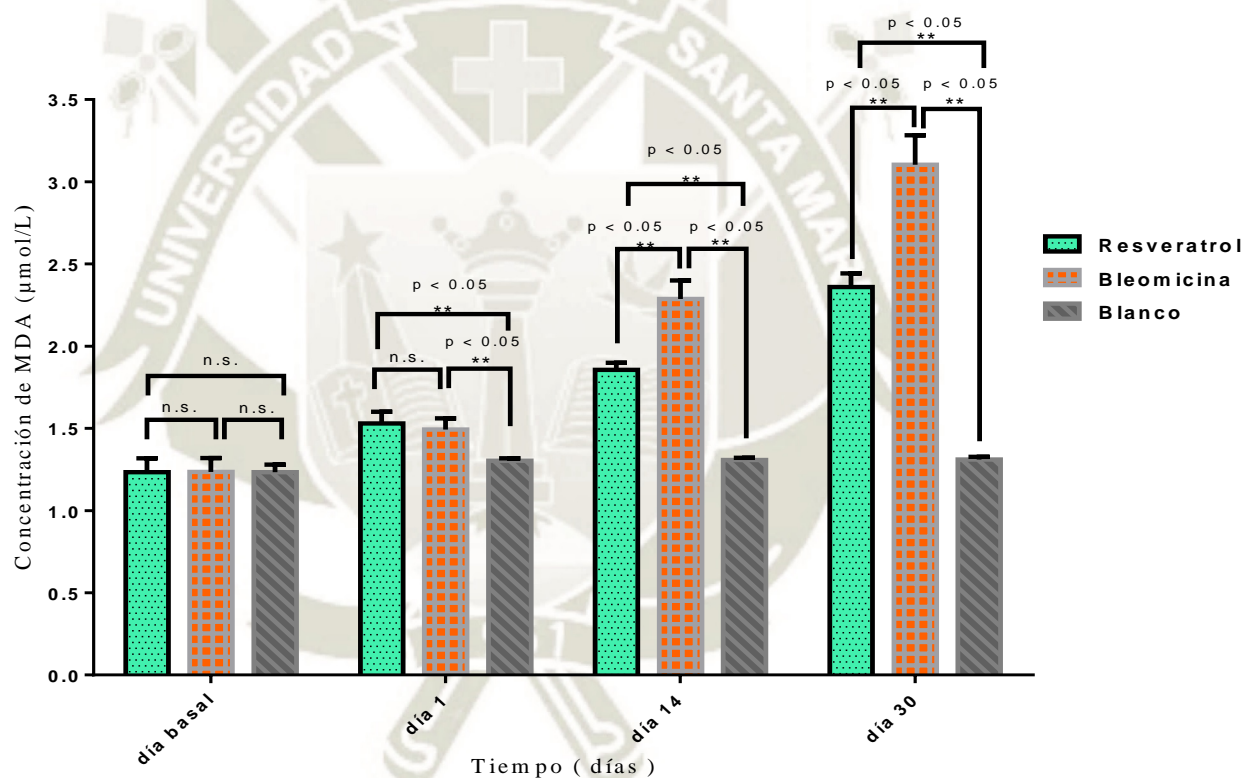
*Fuente: Elaboración propia.*

$H_0$ : Hipótesis nula = No existe diferencia significativa;  $p > 0.05$

$H_1$ : Hipótesis alternativa= Si existe diferencia significativa;  $p \leq 0.05$

Teniendo en cuenta que, el valor obtenido de  $p = 5.449 \times 10^{-24}$  es menor a 0.05, se acepta la hipótesis alternativa y rechazamos la hipótesis nula; por lo tanto, existe una gran diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos experimentales: tratamiento, control positivo y blanco. De esta forma, se demostró que los niveles de MDA se expresaron en condiciones desiguales entre ellos, durante 30 días de experimentación. Hecho que apoya este resultado fue que no todos ellos recibieron el mismo tratamiento; como por ejemplo, el subgrupo blanco no fue expuesto a ningún tóxico, por lo cual el aumento de este indicador de estrés oxidativo no fue evidenciado; mantenido sus concentraciones basales MDA promedio de 1.268  $\mu\text{mol/L}$  hasta la etapa final, 1.311  $\mu\text{mol/L}$ , sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

Como se puede observar en la **Figura 40**, los niveles de MDA en suero sanguíneo, aumentaron considerablemente por 30 días; llegando a un promedio de 1.236 a 3.103  $\mu\text{mol/L}$  y 1.234 a 2.361  $\mu\text{mol/L}$ , de los subgrupos control positivo y tratamiento, respectivamente. Se evidenció, una diferencia significativa entre el subgrupo que recibió como tratamiento una dosis diaria de 75mg/Kg de RSV en contraste con el subgrupo control positivo, que recibió 2.0mg/Kg de BLM y ningún tratamiento; lo que demuestra que esta sustancia mantuvo ejerciendo sus efectos pneumoprotectores hasta la etapa final experimental, mitigando o contrarrestando el daño causado por el tóxico en el tejido pulmonar.



**Figura 40.** Comparación de los niveles de MDA del grupo B.

Los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del RSV demostraron una vez más tener capacidad pneumoprotectora, especialmente durante la etapa fibrótica que fue desarrollándose aproximadamente tras 10 y 14 días de exposición al tóxico. Podemos así hacer mención que esta sustancia influyó sobre ciertos factores fibróticos que se expresan en esta enfermedad, como por ejemplo el TGF- $\beta$ , que es una citocina fuertemente relacionada la formación de tejido fibroso en el parénquima pulmonar

en la IPF. El RSV protegió el tejido pulmonar durante la etapa inflamatoria y fibrótico del modelo murino experimental inducido por BLM.

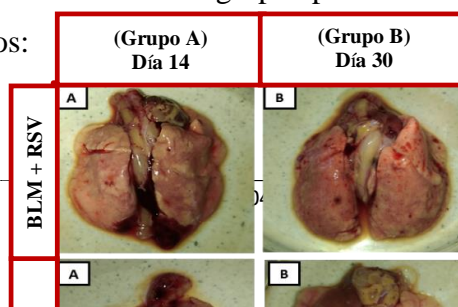
En el 2012, Recep Akgedik y col., evaluaron los efectos terapéuticos del RSV en el modelo de FP inducido por BLM en ratas. El estudio se enfocó en el rol de este componente por 29 días, administrándolo 14 días después de la inducción intratraqueal del toxico. En la cuantificación del MDA, los niveles en suero incrementaron hasta  $2.58 \pm 0.61 \mu\text{mol/L}$  en los controles positivos, comparándolos con los controles, indicaron concentraciones de  $0.77 \pm 0.24 \mu\text{mol/L}$ . Sin embargo, los animales tratados con RSV post-inducción, alcanzaron concentraciones de  $1.59 \pm 0.30 \mu\text{mol/L}$  de MDA en suero sanguíneo.<sup>51</sup> Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación, evidenciaron igualmente una disminución en los niveles de concentraciones de MDA en suero sanguíneo, debido al tratamiento con RSV; aunque, no se asemejan nuestros datos, puede ser debido a la variabilidad presente en los animales de experimentación.

Por otro lado, en el 2012, Xiaoqing He y col., evaluaron los efectos del RSV para inhibir la respuesta fibrogénica y estrés oxidativo por inducción del paraquat (un herbicida usado mundialmente) en células epiteliales bronquiales humanas normales. El RSV a una dosis de  $10 \mu\text{M}$  inhibió los efectos tóxicos del paraquat, disminuyendo la producción de factores profibrogénicos e inflamatorios y suprimió la inducción de fibroblastos pulmonares humanos a miofibroblastos.<sup>52</sup> Como se aprecia, el RSV también puede emplearse para demostrar sus propiedades terapéuticas *in vitro*.

## 5. BIOPSIAS PULMONARES

### 5.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICOS DE PULMONES DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B

Una vez extraídos los pulmones de los animales de experimentación, se realizó un análisis visual y comparativo entre los grupos pertenecientes A y B, obteniéndose los siguientes resultados:





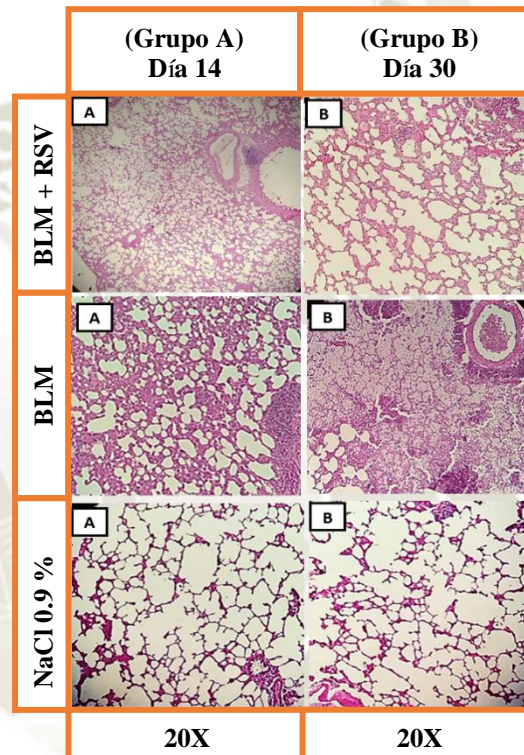
**Figura 41.** Biopsias pulmonares representativas pertenecientes a los grupos experimentales A (día 14) y B (día 30).

Mientras que, los pulmones de los subgrupos que recibieron únicamente solución salina (NaCl 0.9%) por vía oral durante la etapa experimental; no presentaron daños en sus características morfológicas, su coloración fue rosada y homogénea, de apariencia y consistencia normal. Por otro lado, los pulmones de los subgrupos que recibieron el tóxico y ningún tratamiento, en el día 14, presentaron daños visibles en su morfología, áreas rojizas y oscuras, a diferencia del día 30 de experimentación, que se visualizó zonas blanquecinas y una gran distorsión en su morfología. Finalmente, en los subgrupos que recibieron como tratamiento RSV a una dosis de 75mg/kg/día, se distinguió un menor daño por BLM en el desarrollo de IPF inducida, apreciándose características similares a los subgrupos que recibieron únicamente solución salina. **(Figura 41).** En el 2001, M. Emilia Juan y col., evaluaron los efectos tóxicos del RSV a altas dosis, concluyendo que la administración diaria de componente no produce efectos perjudiciales a altas dosis, teniendo un alto margen de seguridad.<sup>64</sup>

## 5.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DE CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO PULMONAR DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN

### 5.2.1. ANÁLISIS DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN POR EL MÉTODO DE ASHCROFT EN LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B – TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

Se obtuvo los siguientes resultados de la tinción hematoxilina eosina, una vez realizados los cortes histológicos:



**Figura 42.** Tinciones histológicas representativas de H&E pertenecientes a los grupos A (día 14) y B (día 30)

Los subgrupos blancos, a los cuales se les administró solución salina únicamente por vía oral, presentaron una arquitectura pulmonar normal, con morfología alveolar bien definida sin mostrar daño alguno ni engrosamiento de las paredes bronquio-alveolares. La coloración rojiza a rosa, son pertenecientes a la musculatura y tejido conectivo normal. Los subgrupos patrón positivo a los que se le realizó la instilación de BLM intratraquealmente, sin recibir ningún tratamiento, presentaron una arquitectura pulmonar distorsionada con daño evidente. El patrón histológico mostrado en el día 14, nos muestra un moderado engrosamiento de las paredes pulmonares y ligera formación de masas fibróticas. Los espacios

alveolares no se encuentran colapsados, sin embargo, se logra visualizar algunos núcleos celulares, evidenciados por su coloración violeta/purpura. Las características mostradas en el día 30, revelan un daño severo mucho más pronunciado por el colapso alveolar por infiltración celular, formación de masas fibróticas y destrucción total del parénquima pulmonar por remodelación aberrante de la matriz extracelular.

Por otro lado, el patrón histológico de los subgrupos que recibieron RSV como tratamiento, mostraron una protección frente a los efectos de la BLM, tanto en el día 14 como en el día 30. Los alveolos no estuvieron colapsados; técnicamente la arquitectura pulmonar mantuvo su morfología casi intacta, solo se observó un ligero engrosamiento de las paredes alveolares y pequeñas fibras de tejido conjuntivo en ciertas zonas (coloración rosa tenue). **(Figura 42)** Para determinar una diferencia entre la escala de puntuación del método de ashcroft entre los grupos A y B **(Cuadro 36)** de dicha tinción, se realizó un análisis de varianza de 1 vía **(Cuadro 37)**, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 36.** Resultados de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B – H&E.

GRUPO A (14 días)			GRUPO B (30 días)		
Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco	Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco
2.20	3.20	0.80	3.20	6.20	0.40
3.00	3.20	0.60	3.75	6.80	0.60
2.20	3.00	0.60	4.00	6.60	0.20
2.00	3.60	0.60	3.80	6.20	0.80
$\bar{x} \pm DS = 2.35 \pm 0.44$	$\bar{x} \pm DS = 3.25 \pm 0.25$	$\bar{x} \pm DS = 0.65 \pm 0.10$	$\bar{x} \pm DS = 3.69 \pm 0.34$	$\bar{x} \pm DS = 6.45 \pm 0.30$	$\bar{x} \pm DS = 0.50 \pm 0.26$

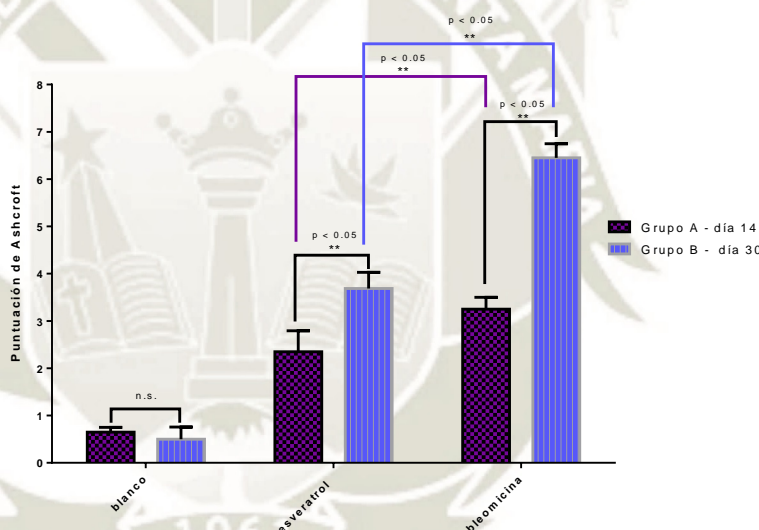
*Fuente: Elaboración propia.*

**Cuadro 37.** Análisis de varianza de la escala de puntuación del método de ashcroft – H&E

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	215.543	$2.101 \times 10^{-15}$	2.773

*Fuente: Elaboración propia.*

Teniendo en cuenta que, el valor obtenido de  $p = 2.101 \times 10^{-15}$  es menor a 0.05, nos demuestra que si existe una diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft entre los grupos A y B en la tinción de hematoxilina y eosina.



**Figura 43.** Comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B - Tinción hematoxilina y eosina.

**Cuadro 38.** Test de tukey de la escala de puntuación del método ashcroft de los grupos A y B – H&E.

CONTRASTE	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	LÍMITE	RESULTADO
<b>RSV14A - BLM14A</b>	<b>0.900</b>	<b>0.676</b>	<b>Si hay diferencia</b>
RSV14A - BLANCO14A	1.700		Si hay diferencia
<b>RSV14A - RSV30B</b>	<b>1.338</b>		<b>Si hay diferencia</b>
RSV14A - BLM30B	4.100		Si hay diferencia
RSV14A - BLANCO30B	1.850		Si hay diferencia
BLM14A - BLANCO14A	2.60		Si hay diferencia
BLM14A - RSV30B	0.438		No hay diferencia
<b>BLM14A - BLM30B</b>	<b>3.200</b>		<b>Si hay diferencia</b>

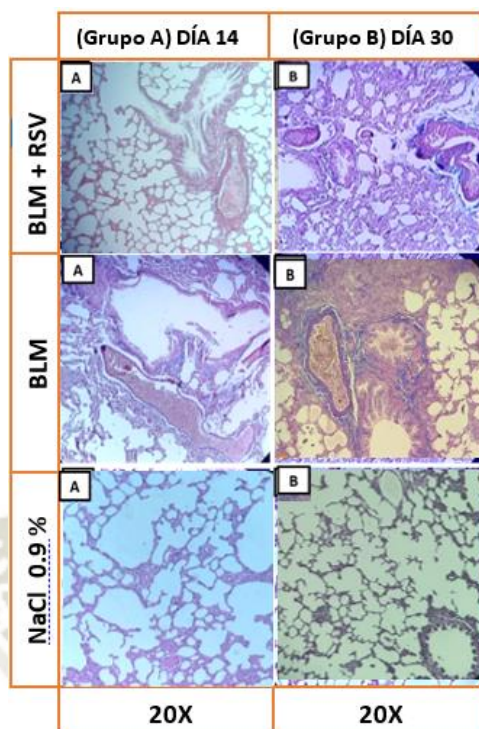
BLM14A - BLAMCO30B	2.750	Si hay diferencia
BLANCO14A - RSV30B	3.038	Si hay diferencia
BLANCO14A - BLM30B	5.800	Si hay diferencia
<b>BLANCO14A - BLANCO30B</b>	<b>0.150</b>	<b>No hay diferencia</b>
<b>RSV30B - BLM30B</b>	<b>2.763</b>	<b>Si hay diferencia</b>
RSV30B - BLANCO30B	3.188	Si hay diferencia
BLM30B - BLANCO30B	5.950	Si hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey (**Cuadro 38**), nos confirmó que si existe un efecto pneumoprotector del RSV (**Figura 43**), a través del paso del tiempo de los subgrupos tratamiento en comparación con los controles positivos, en la tinción de hematoxilina y eosina.

### 5.2.2. ANÁLISIS DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN POR EL MÉTODO DE ASHCROFT EN LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B – TINCIÓN TRICOMICO DE MASSON

Se obtuvo los siguientes resultados de la tinción de masson, una vez realizados los cortes histológicos: El patrón histológico mostrado en los subgrupos blanco, tanto en el día 14 y 30, no mostraron engrosamiento de las paredes alveolares ni deposiciones de matriz extracelular; por lo que su morfología se mantuvo intacta. Continuando con el subgrupo control positivo, que recibió BLM sin tratamiento alguno; se observaron deposiciones y masas fibróticas evidenciadas por una coloración azul y violeta. El daño fue más pronunciado en el día 30, comprometiendo críticamente los alveolos pulmonares. Finalmente, el grupo tratamiento al igual que en la tinción histológica de hematoxilina y eosina; el RSV protegió la arquitectura pulmonar, revelando un moderado engrosamiento de los septos alveolares tanto como las paredes bronquio-alveolares y una disminuida deposición de matriz extracelular. (**Figura 44**)



**Figura 44.** Tinciones histológicas representativas de tricrómico de masson pertenecientes a los grupos A (día 14) y B (día 30).

Para determinar una diferencia entre las puntuaciones de la escala de ashcroft entre los grupos A y B (**Cuadro 39**) de dicha tinción, se realizó un análisis de varianza de 1 vía (**Cuadro 40**), obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro 39.** Resultados de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B – Tricómico de masson.

GRUPO A (14 días)			GRUPO B (30 días)		
Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco	Subgrupo tratamiento (resveratrol)	Subgrupo control positivo (bleomicina)	Subgrupo blanco
2.40	4.20	0.40	3.40	3.60	0.80
2.20	3.20	0.60	3.00	5.40	0.40
2.80	3.80	0.40	3.00	5.20	0.40
2.40	3.80	0.60	3.20	5.60	0.60
$\bar{x} \pm DS = 2.45 \pm 0.25$	$\bar{x} \pm DS = 3.75 \pm 0.41$	$\bar{x} \pm DS = 0.5 \pm 0.12$	$\bar{x} \pm DS = 3.15 \pm 0.19$	$\bar{x} \pm DS = 5.85 \pm 0.91$	$\bar{x} \pm DS = 0.55 \pm 0.19$

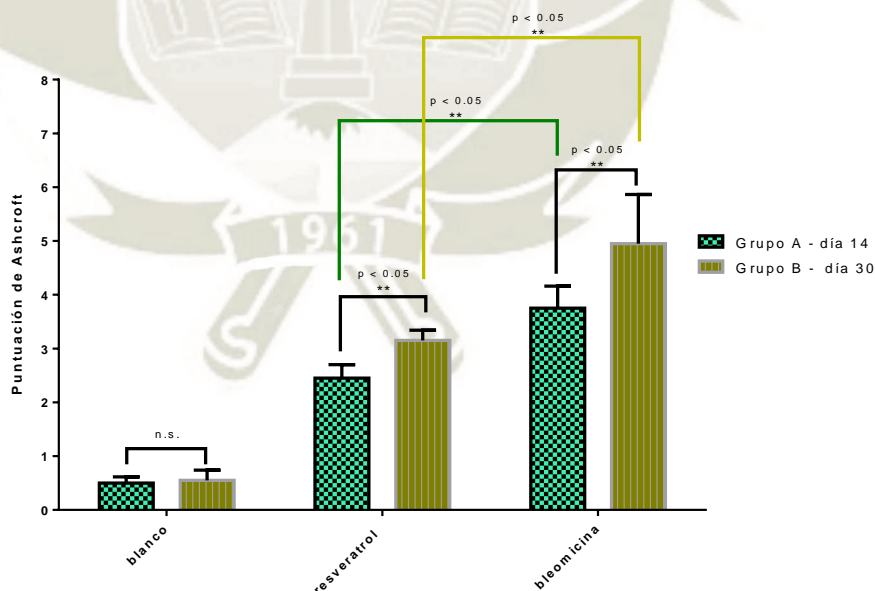
*Fuente: Elaboración propia*

**Cuadro 40.** Análisis de varianza de la escala de puntuación del método ashcroft – Tricómico de masson.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	65.452	$6.531 \times 10^{-11}$	2.773

*Fuente: Elaboración propia.*

Teniendo en cuenta que, el valor obtenido de  $p = 6.531 \times 10^{-11}$  es menor a 0.05, nos demuestra que si existe una diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft entre los grupos A y B en la tinción de tricómico de masson.



**Figura 45.** Comparación de la escala de puntuación del método de ashcroft de los grupos A y B - tinción tricrómico de masson.

**Cuadro 41.** Test de tukey de la escala de puntuación del método ashcroft de los grupos A y B – Tricómico de masson.

CONTRASTE	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	LÍMITE	RESULTADO
<b>RSV14A - BLM14A</b>	<b>1.30</b>	<b>0.99</b>	<b>Si hay diferencia</b>
RSV14A - BLANCO14A	1.95		Si hay diferencia
<b>RSV14A - RSV30B</b>	<b>3.15</b>		<b>Si hay diferencia</b>
RSV14A - BLM30B	3.40		Si hay diferencia
RSV14A - BLANCO30B	1.90		Si hay diferencia
BLM14A - BLANCO14A	3.25		Si hay diferencia
BLM14A - RSV30B	0.60		No hay diferencia
<b>BLM14A - BLM30B</b>	<b>2.10</b>		<b>Si hay diferencia</b>
BLM14A - BLANCO30B	3.20		Si hay diferencia
BLANCO14A - RSV30B	2.65		Si hay diferencia
BLANCO14A - BLM30B	5.35		Si hay diferencia
<b>BLANCO14A - BLANCO30B</b>	<b>0.05</b>		<b>No hay diferencia</b>
<b>RSV30B - BLM30B</b>	<b>2.70</b>		<b>Si hay diferencia</b>
RSV30B - BLANCO30B	2.60		Si hay diferencia
BLM30B - BLANCO30B	5.30		Si hay diferencia

*Fuente: Elaboración propia.*

El test de tukey (**Cuadro 41**), confirmó nuevamente que, si existe un efecto pneumoprotector del RSV (**Figura 45**), a través del paso del tiempo de los subgrupos tratamientos en comparación con los subgrupos controles positivos, en la tinción de tricómico de masson.

En el 2006, Goksel Sener y col., investigaron las propiedades antioxidantes del RSV en el modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por BLM por 14 días de tratamiento con RSV, logrando revertir las alteraciones histopatológicas inducidas por el toxico, de un promedio de  $8.0 \pm 0.5$  del control positivo a un promedio de  $4.2 \pm 0.4$  tratado con RSV.<sup>54</sup>

Al igual que el RSV, otros estudios emplearon otras sustancias como tratamientos en el mismo modelo de IPF inducido por BLM, como, por ejemplo:

En el 2014, Zongmei Zhang y col., utilizaron la vitamina D como dieta suplementaria para reducir la severidad de la FP y acumulación de células inflamatorias, en 3 intervalos de tiempo (días 14,21 y 28); logrando de esta manera prevenir cambios estructurales histológicos debido al tóxico, como el



engrosamiento de membranas basales, deposición de fibrina intersticial, en tinciones histológicas de hematoxilina y eosina y tricómico de masson.<sup>8</sup>

En el 2013, Ramesh Verma y col., evaluaron el efecto la quercetina, un flavonoide, como un tratamiento diario por 20 días. Logrando evidenciar un efecto reversible en la deposición de matriz extracelular pulmonar (colágeno) y aumentar la capacidad antioxidante en el tejido pulmonar. En la tinción histológica de tricómico de masson, se observaron cambios significativos debido a la disminución de deposición de fibras colágenas.<sup>35</sup>

En el 2014, Hongyun Zhao y col., realizaron un trabajo empleando el ácido docosahexanoico (DHA) como tratamiento, demostrando los efectos preventivos y protectores de este componente, en cambios funcionales asociados por el daño del toxico y descenso de ciertas citoquinas involucradas en el desarrollo de la enfermedad; durante un periodo experimental de 21 días.<sup>25</sup>

En el 2014, Joshua Lawrenz y col., emplearon el aceite de linaza, como un tratamiento diario en el mismo modelo; demostrando efectos protectores de este componente, como retraso en la formación de edemas y un descenso de infiltración de células inflamatorias, visualizados en tinciones histológicas de tricómico de masson; durante un periodo experimental de 21 días.<sup>38</sup>



# **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS**

## CONCLUSIONES

1. Se logró reproducir exitosamente el modelo animal de fibrosis pulmonar idiopática en ratas *Wistar*.
2. Se cuantificó los niveles de MDA suero sanguíneo y se logró comparar que los animales de experimentación a los cuales se les instiló BLM y recibieron como tratamiento RSV, expresaron menores concentraciones del radical libre, frente a los que no recibieron tratamiento.
3. Se comparó y semi-cuantificó, por medio de tinciones de cortes histológicos, los patrones característicos de la enfermedad pulmonar, evidenciando un efecto protector en la arquitectura pulmonar del RSV, en contraste al control positivo.
4. Se demostró que, el resveratrol al poseer propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, actuó como un agente pneumoprotector en la inducción de fibrosis pulmonar idiopática en el modelo animal.

### SUGERENCIAS

1. El presente proyecto se enfocó en el estudio de la actividad pneumoprotectora del RSV como tratamiento durante el curso de la IPF inducida por BLM; por lo que estudios futuros podrían considerar la administración del RSV como un agente profiláctico en el desarrollo del modelo animal con BLM.
2. Se propone ampliar el tiempo de experimentación en el modelo animal con la administración de RSV.
3. Se sugiere evaluar los efectos de diferentes dosificaciones de RSV, así como las tóxicas, en el tratamiento del modelo de la enfermedad pulmonar.
4. Estudios futuros podrían considerar la administración conjunta del RSV, con uno o varios tratamientos farmacológicos para potenciar la actividad pneumoprotectora en el modelo de IPF inducida.



## REFERENCIAS

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Talmadge J.A. Celorio; F. Calero; A. Armas. Fundamentos de oncología Ginecológica, 1968; Ediciones Díaz de Santos, S.A. Primera edición, 1968.España.
2. J.V. Barbas J.V., Ferreira M. A, Sesso A, Kairalla R.A., Carvalho C.R., Capelozz V. L. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). 2001; 54:132–138.
3. Ramesh Verma, Lokendra Kushwah, Darpesh Gohel, Manish Patel, TulsiMarvania, and Suresh Balakrishnan. Evaluating the Ameliorative Potential of Quercetin against the Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Wistar Rats. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2013, Article ID 921724, 10 pages
4. Sánchez L. I. Interacción entre células alveolares y fibroblastos para el desarrollo de terapias para la Fibrosis Pulmonar.
5. Della Latta V, Cecchetti A, Del RS, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. Pharmacol. Res. 2015 Jul;97:122-30.
6. Brandan N, Aquino E.J., Codutti A. Respuesta Inmunitaria. Cátedra de bioquímica 2007.
7. Jara PD. Actividad gelatinolítica en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones transgénicos que sobre expresan MMP. 2006.
8. Edgar Gómez López. Fibrosis Pulmonar Idiopática, evolución y nuevos tratamientos. Tesis. España. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
9. Paul J. Wolters, Harold R. Collard, and Kirk D. Jones. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Annu Rev. Pathol. 2014; 9: 157–179.
10. Higuera Luis M.Efecto Cardioprotector del Resveratrol: Mecanismos implicados 2015; 9-12.
11. Zhao, H., Chan-Li, Y., Collins, S. L., Zhang, Y., Hallowell, R. W., Mitzner, W., & Horton, M. R. 2014. Pulmonary delivery of docosahexaenoic acid mitigates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. BMC Pulmonary Medicine, 14(1), 1–10.
12. Maigualida T. Fernández Rey; Fibrosis Pulmonar por Adriamicina. Implicación de Goodpasture Antigen Binding Protein (GPBP) en su patogenia. Tesis. España. Dpto. de Biología Molecular. Universidad de cantabria. 2013.

13. Charlín Méndez Cordovez. Efectos del ozono en un modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina. Tesis. España. Dpto. de Patología Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Campus Universitario de Arucas, Facultad de Veterinaria. Unidad de Investigación. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. 2015.
14. Eficacia y seguridad del uso de Nintedanib en el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática. Dictamen preliminar de evaluación de tecnología sanitaria. Instituto de evaluación de tecnologías en salud e investigación. Perú. 2017
15. Soo Nam Kim, Jinsoo Lee<sup>1</sup>, Hyo-Seon Yang<sup>1</sup>, Jae-Woo Cho, Soonjin Kwon<sup>1</sup>, Young-Beom Kim, Jeong-Doo Her, Kyu-Hyuk Cho, Chang-Woo Song and Kyuhong Lee. Dose-response Effects of Bleomycin on Inflammation and Pulmonary Fibrosis in Mice. Official journal of Korean Society of Toxicology. 2010. Vol. 26, No. 3, pp. 217-222.
16. Jun Tashiro, Gustavo A. Rubio, Andrew H. Limper, Kurt Williams, Sharon J. Elliot, Ioanna Ninou, Vassilis Aidinis, Argyrios Tzouveleakis and Marilyn K. Glassberg. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. 2017. doi: 10.3389/fmed.2017.00118.
17. Prieto AM, Escudero JB, Girón H y Sanz JM. Respuesta Inmune Adaptativa y sus implicaciones Fisiológicas. 2017;12(24):1398-407.
18. Zongmei Zhang, Xiaoting Yu, Xia Fang, Aibin Liang, Zhang Yu, Pan Gu, Yu Zeng, Jian He, Hailong Zhu, Shuai Li, Desheng Fan, Fei Han, Lanjing Zhang, and Xianghua Yi. Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Sci. Rep. 2015; 5: 17638.
19. Fahim A. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Department of Respiratory Medicine; University of Hull and Division of Cardiovascular and Respiratory Studies Castle Hill Hospital Cottingham. 2011.
20. Vega R.G. Inmunidad Natural o Innata., Vol. 51 No. 4, 2008;(8).
21. Belmunt L.G., Sibila O. Mecanismo de Defensa Pulmonar. 2013;6(2):15-2.
22. Hay John, Shahzeidi Shahria, Lauren Geoffrey. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. 1990;65:81-94
23. Pedreira PR, García PE, Albaiceta GM, TABOADA F. Inflamatoria y Apoptosis en la lesión pulmonar aguda. 2006;30(6):268-75.

24. Marios Angelos Mouratis, Vassilis Aidinis. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2011, 17:355–361.
25. Molina, Trigueros J.A. Quintano E. Mascarós, Xaubet A. Ancochea J. Idiopathic pulmonary fibrosis: A challenge for primary care. 2014; (3):134-142.
26. Mathai SK, Newton CA, Schwartz DA, Garcia CK. Pulmonary fibrosis in the era of stratified medicine. *Thorax*. 2016 Dec;71(12):1154-1160.
27. Spagnolo P, Tzouvelekis A, Bonella F. The management of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. 2018; (5)148. doi:10.3389/fmed.2018.00148.
28. J.V. Barbas J.V., Ferreira M. A, Sesso A, Kairalla R.A. , Carvalho C.R., Capelozz V. L. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). 2001; 54:132–138.
29. Gambini Juan, López G Raúl, Olaso G Gloria , Abdelazid Khira , Vicent Bonet C , Borrás Consuelo Vina. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. 2013;48(2):79–88.
30. Dra. Ingrid Melgarejo Pomar, Dra. Elfride Balanza Erquicia. Estandarizacion de metodos espectrofotometricos para la determinacion de malondialdehido y carboxihemoglobina en estrés oxidativo. Tesis. La Paz - Bolivia. Facultad de Ciencias Farmaceuticas Y Bioquímicas, carrera de Bioquímica. Universidad Mayor De San Andres. 2014.
31. Alder JK, Chen JK, Lancaster Lisa, Danoff Sonye, Vulto Irma, Xie† Mingyi, Xiaodong Qi, Rubin M, et al. Short telomeres are a risk factor for Idiopathic Pulmonary fibrosis. 2008; (35): 13051- 13056.
32. Roman F.J. Evaluacion del estres oxidativo en fibrosis Pulmonar Inducida experimentalmente por talco: papel de la suplementación con tocofenol .2015.
33. Cheresch Paul, Seok-Jo Kim, Tulasiram Sandhya, Kamp David W. Oxidative stress and Pulmonary Fibrosis. 2013;(1839) 1028–1040.
34. Antje Moeller, Kjetil Ask, David Warburton, Jack Gauldie, and Martin Kolb. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2008; 40(3): 362–382.
35. Ganesh Raghu, Harold R, Martinez, Juergen Behr, Brown Kevin, Thomas Colby V, Francxois Cordier Jean, Flaherty Kevin R, Lasky Joseph., David A, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based



- Guidelines for Diagnosis and Management. 2011: (183):788–824. DOI: 10.1164/rccm.2009-040GL.
36. Mejía Mayra. Tabaquismo y Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. 1996; 153: 861-865.
37. Redente EF, Jacobsen KM, Solomon JJ, Lara AR, Faubel S., Keith RC, Henson PM, Downey GP, Riches DW. Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2011 Oct;301(4):L510-8.
38. Carbajal Paolo, Rúsbel Yéfrind. Enfermedad por reflujo gastroesofágico como factor asociado a fibrosis pulmonar idiopática, hospital regional docente de trujillo, 2016.
39. Ramos A. C, Becerril BC, Cisneros J.G., Montaña M., Ramírez M.M. El miofibroblasto una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004 Sep ; 17( 3 ): 215-231. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-75852004000300008&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000300008&lng=es)
40. Antje Moeller, Kjetil Ask, David Warburton, Jack Gauldie, and Martin Kolb. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008; 40(3): 362–382.
41. Kamal Razavi-Azarkhiavi, Mehdi Ali-Omrani, Reza Solgi, Pezhman Bagheri, Mehdi Haji-Noormohammadi, Nahid Amani & Mohammad-Reza Sepand, 2014, Silymarin alleviates bleomycin-induced pulmonary toxicity and lipid peroxidation in mice, *Pharmaceutical Biology*, 52:10, 1267-1271, DOI: 10.3109/13880209.2014.889176.
42. Xaubet A., Ancochea J., Bollo E, Fernández F.F., Franque T, et al. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la Fibrosis pulmonar idiopática. 2013; 49(8):343–353.
43. Chino Yolanda, Orozco I. Marisol, Chaverri P. Jose. Evidencia de participación del peróxido en diversas enfermedades. 2006;(4):350-358.
44. Sierra Marta P, Guzmán A. Martin, Olivares Ivonne, Torres R. Yessica, Hicks Juan J. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares .2004;(2):135-148.

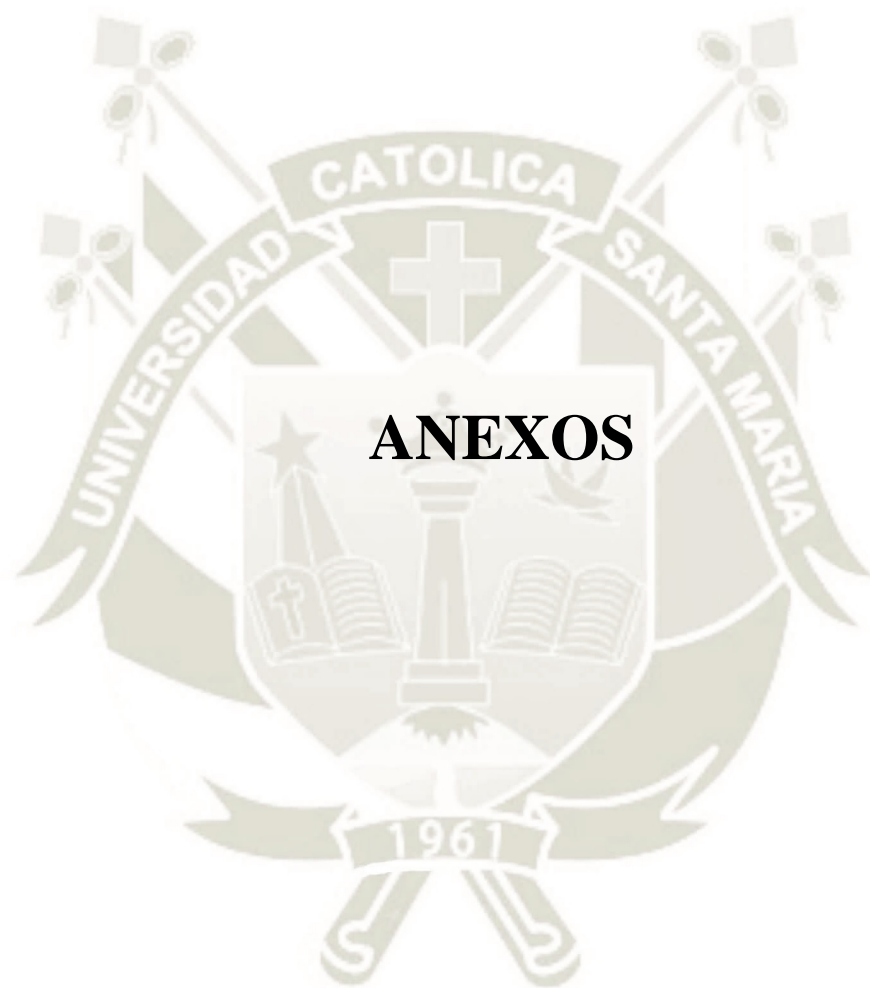
45. Ayala Anonio, Muñoz F. Mario, Argüelles Sandra. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. 2014; (31): 30-32.
46. Fernández C. Ángel. Estudio del estado oxidativo en individuos sanos y distintos grupos patológicos. 2014; (4): 312-318.
47. Abdulaleem A.A. The role of the Four and a half LIM only protein 2 (FHL2) in bleomycin induced lung fibrosis. 2013.
48. Londoño L Juan. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. 2008;(9):30-34.
49. Burley SV. Review of current literature on the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. 2016.
50. Sajad A, Maryam K, Aziz S, J Vargas D. Claudia, Gochicoa R Laura, Velázquez Monica, Mejía Roberto, Alfaro, Juan, et al. Pruebas de función respiratoria, ¿cuál y a quién? 2014; (2) :99-115.
51. Afar S, Abolghasem J, et al. Effects of Analytical Procedures on the Repeatability of Malondialdehyde Determinations in Biological Samples. 2017; (23):193-197.
52. Asociación Latinoamericana de Tórax ALAT. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, 2015: 1-24.
53. Talmadage E. King Jr, Annie Pardo, Selman M. Fibrosis pulmonar idiopática Enfermedad pulmonar crónica, progresiva, irreversible y letal, de causa desconocida.2011; 378: 1949–61.
54. Gutierrez M. Ana. Composición de ácidos grasos y peroxidación lipídica de mitocondrias. 2015 ;( 221) 1256-1264.
55. Bethany B. Moore<sup>1</sup>, William E. Lawson<sup>4,5</sup>, Tim D. Oury<sup>6</sup>, Thomas H. Sisson<sup>1</sup>, Krishnan Raghavendran<sup>2</sup>, and Cory M. Hogaboam<sup>3</sup>. Animal Models of Fibrotic Lung Disease. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2013. Vol 49, Iss. 2, pp 167–179.
56. Millán P. Fernando, Serrano Gabriel, Inmaculada L. Expósito Martín. Nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento . 2006;7-8.
57. Carrion valero F., Marin Pardo J. Toxicidad Pulmonar por Farmacos. Arch Bronconeumol, 1999; 35: 550-559.
58. M. Emilia Juan, M. Pilar Vinardell and Joana M. Planas. The Daily Oral Administration of High Doses of trans-Resveratrol to Rats for 28 Days in not harmful. American Society for Nutritional Sciences. 2001. 0022-3166/02.

59. Daniela Impellizzeri, Elena Talero, Rosalba Siracusa, Antonio Alcaide, Marika Cordaro, Jose Maria Zubelia, Giuseppe Bruschetta, Rosalia Crupi, Emanuela Esposito, Salvatore Cuzzocrea<sup>1</sup> and Virginia Motilva. Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis in mice. *British Journal of Nutrition*. 2015, 114, 853–865.
60. Fioret D. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis, management, and the search for a cure. 2012;(1) 437.
61. Xiao-dan Zhu, Xiao-ping Lei, Wen-bin Dong. Resveratrol as a potential therapeutic drug for respiratory system diseases. *Dovepress*. 2017;11 3591–3598.
62. Arenas Montalvo, Suhelen; Ccahuana Nuñoncca, Yanet. Efecto del resveratrol sobre el perfil lipídico en animales de experimentación con dislipidemia inducida. Tesis. Perú-Arequipa. Facultad de ciencias farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas. universidad católica de santa maría. 2015.
63. Bethany B. Moore<sup>1</sup>, William E. Lawson<sup>4,5</sup>, Tim D. Oury<sup>6</sup>, Thomas H. Sisson<sup>1</sup>, Krishnan Raghavendran<sup>2</sup>, and Cory M. Hogaboam<sup>3</sup>. Animal Models of Fibrotic Lung Disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2013. Vol 49, Iss. 2, pp 167–179
64. Robert W. Fleischman, John R. Baker, George R. Thompson, Ulrich H. Schaeppi, Vladimir R. Illievski, David A. Cooney, and Ruth D. Davis. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax* (1971), 26, 675.
65. Ian Y. R. Adamson, PhD and Drummond H. Bowden, MD. The Pathogenesis of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. From the Department of Pathology, University of Manitoba Faculty of Medicine, Winnipeg, 'Manitoba, Canada. 1974. Vol.77 N° 2.
66. Roger S. Thrall, PhD, James R. McCormick, MD, Richard M. Jack, BA, Richard A. McReynolds, MD, and Peter A. Ward, MD. Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in the Rat, Inhibition by Indoniethacin. *American Journal of Pathology*. 1979. Vol. 95. N°1.
67. Chabalgoity J., Pereira M., Rial A. Inmunidad contra los agentes infecciosos. 2003.
68. Nathachit Limjunyawong, Wayne Mitzner, and Maureen R. Horton. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol. Rep*. 2014 Feb 1; 2(2): e00249.
69. Kristina Rydell-Tormanen, Kristofer Andreasson, Roger Hesselstrand, Juha Risteli, Dick Heinegard, Tore Saxne and Gunilla Westergren-Thorsson. Extracellular matrix

- alterations and acute inflammation; developing in parallel during early induction of pulmonary fibrosis. *Laboratory Investigation* (2012) 92, 917–925.
70. Heba E. Essa, Sayed A. Abdelhafez, Mohammad E. Abu. Shehata, Fatma. E. Mostafa, Amal Fathy, Bassma Hamed, Mohamed A. Sobh. Evaluation of different time courses of bleomycin to induced interstitial pulmonary fibrosis in C57BL6 mice. *International Journal of Applied Research* 201 6; 2(5): 322 -3 2 6.
71. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease. *PLoS One* (2013) 8(4):e59348. doi: 10.1371/journal.pone.0059348.
72. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2010) 299(4):L442–52. doi:10.1152/ajplung.00026.2010.
73. J M Simpson, and V. Timbrell. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* 1988 Apr; 41(4): 467–470.
74. Cascales MA, Álvarez JA. Telomeros y telomerasa, sus implicaciones en el envejecimiento y el cáncer. 2010; (14) 49-70.
75. Profesores, C., Garc, A., Elbal, T., Pilar, L., & Garc, S. (2011). Área de biología celular. Técnicas instrumentales básicas, Área de Biología Celular. Disponible en: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/17491/1/ActividadesPR%C3%81CTICAS.pdf>
76. Joshua Lawrenz,<sup>1</sup> Betty Herndon,<sup>2</sup> Afrin Kamal,<sup>3</sup> Aaron Mehrer,<sup>4</sup> Daniel C. Dim,<sup>3</sup> Cletus Baidoo,<sup>3</sup> David Gasper,<sup>1</sup> Jonathan Nitz,<sup>1</sup> Agostino Molteni,<sup>3</sup> and Richard C. Baybutt. Dietary Flaxseed Oil Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2012, Article ID 457031, 11 pages.
77. Dacia Malambo García<sup>1</sup>, Luis Veloza Cabrera<sup>2</sup>, Marta Tuñón Pitalúa<sup>3</sup>, Javier Baena Del Valle, Gustavo Mora-García, Gabriel Ibarra Jiménez, Claudio Gómez-Alegría, Doris Gómez-Camargo. Construcción de un modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina. *Salud Uninorte*. 2016; 32 (1): 73-83.
78. Recep Akgedik, Şükran Akgedik, Harun Karamanl, Sema Uysal, Bülent Bozkurt, Duygu Ozol, Ferah Armutcu, and Zeki Yildirim. Effect of Resveratrol on Treatment

- of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. ResearchGate. 2012. Vol. 35, No. 5. DOI: 10.1007/s10753-012-9491-0.
79. Xiaoqing He, Liping Wang, Grazyna Szklarz, Yongyi Bi, and Qiang Ma. Resveratrol Inhibits Paraquat-Induced Oxidative Stress and Fibrogenic Response by Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2012. 342:81–90.
80. Goksel Sener, Nurhayat Topaloglu, A. Ozer Sehirli, Feriha Ercan, Nursal Gedik. Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 20-2007, 642–649.





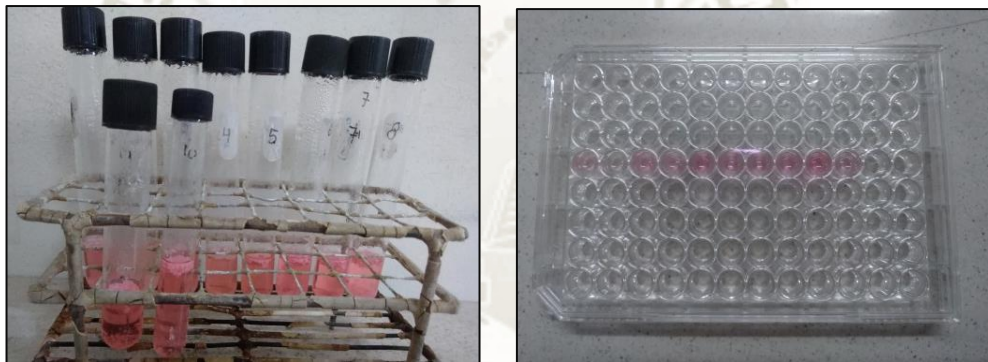
### ANEXO N° 1

#### PROCEDIMIENTO DE INSTILACIÓN INTRATRAQUEAL DE BLM



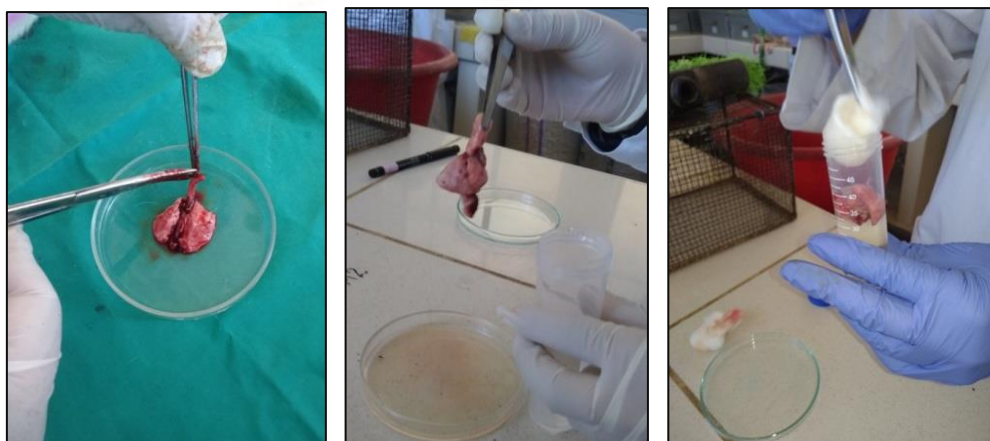
### ANEXO N° 2

#### SIEMBRA DEL COMPLEJO MDA-TBA EN EL PLATILLO DE 96 POCILLOS



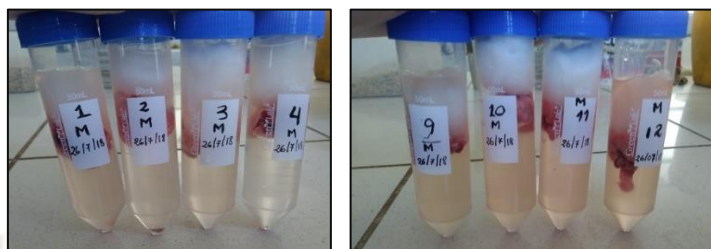
### ANEXO N° 3

#### EXTRACCIÓN Y FIJACIÓN DE PULMONES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



#### ANEXO N° 4

### PULMONES DE RATAS TUBOS FALCON CON FORMALINA 4% Y ESCALA DE PUNTUACIÓN DEL METODO DE ASHCROFT



Grado de Fibrosis	Características Histológicas
0	Pulmón normal
1	Mínimo engrosamiento fibrótico de las paredes alveolares y bronquiales
2 3	Moderado engrosamiento de las paredes sin daños evidentes en la arquitectura pulmonar
4 5	Fibrosis incrementada con daño definitivo en la arquitectura pulmonar y formación de bandas o masas fibróticas.
6 7	Distorsión severa de la estructura y largas áreas de fibrosis, nido de abejas es colocado en esta categoría.
8	Destrucción total fibrótica de todo el campo

Escala de puntuación del método de ashcroft.<sup>6</sup>

#### ANEXO N° 5

### VALORES DE ABSORBANCIA DE LOS ESTÁNDARES DE MALONDIALDEHÍDO

Concentración	Absorbancia	Absorbancia neta
0.3	0.0544	0.0005
0.45	0.0568	0.0029
0.6	0.0582	0.0043
1.2	0.0635	0.0096
2.4	0.0743	0.0204
4.8	0.0968	0.0429

Ecuación de regresión lineal:

$$Y=0.0093x-0.0016$$

Coficiente de correlación:

$$R^2: 0.9994$$

Absorbancia del blanco=0.0539

*Fuente: Elaboración propia.*



**ANEXO N°6**  
**VALORES DE ABSORBANCIA DEL GRUPO DE EXPERIMENTACIÓN DEL**  
**GRUPO A**

Grupo A	Número de rata	Marca de la rata	VALORES DE ABSORBANCIA DE MDA			
			día basal	día 1	día 7	día 14
Subgrupo Resveratrol	1	Cabeza	0.0103	0.0120	0.0138	0.0155
	2	Dorso	0.0092	0.0125	0.0139	0.0159
	3	Cola	0.0105	0.0117	0.0139	0.0160
	4	Pata anterior derecha	0.0093	0.0130	0.0137	0.0160
Subgrupo Bleomicina	9	Pata lado izquierdo	0.0098	0.0123	0.0143	0.0185
	10	Patas delanteras	0.0094	0.0123	0.0140	0.0186
	11	Patas posteriores	0.0103	0.0116	0.0141	0.0186
	12	Patas cruzadas	0.0101	0.0130	0.0141	0.0203
Subgrupo Blanco	17	Cabeza pata anterior derecha	0.0102	0.0104	0.0105	0.0105
	18	Cabeza pata posterior derecha	0.0104	0.0107	0.0102	0.0106
	19	Cabeza pata anterior izquierda	0.0100	0.0104	0.0108	0.0104
	20	Cabeza pata posterior izquierda	0.0095	0.0099	0.0094	0.0102

*Fuente: Elaboración propia.*

**ANEXO N°7**

**VALORES DE ABSORBANCIA DEL GRUPO DE EXPERIMENTACIÓN DEL GRUPO B**

Grupo B	Número de rata	Marca de la rata	VALORES DE ABSORBANCIA DE MDA			
			día basal	día 1	día 14	día 30
Subgrupo Resveratrol	5	Pata posterior derecha	0.0088	0.0132	0.0159	0.0202
	6	Pata anterior izquierda	0.0106	0.0117	0.0161	0.0194
	7	Pata posterior izquierda	0.0098	0.0130	0.0153	0.0212
	8	Pata lado derecho	0.0103	0.0127	0.0154	0.0207
Subgrupo Bleomicina	13	Cuatro patas	0.0093	0.0115	0.0197	0.0276
	14	Cabeza – dorso	0.0104	0.0125	0.0207	0.0295
	15	Dorso – cola	0.0091	0.0130	0.0182	0.0259
	16	Cabeza – dorso – cola	0.0107	0.0121	0.0201	0.0260
Subgrupo Blanco	21	Cola pata anterior derecha	0.0101	0.0106	0.0106	0.0104
	22	Cola pata posterior derecha	0.0105	0.0103	0.0105	0.0105
	23	Cola pata anterior izquierda	0.0100	0.0104	0.0107	0.0108
	24	Cola pata posterior izquierda	0.0102	0.0106	0.0104	0.0107

*Fuente: Elaboración propia.*

ANEXO N° 8

**PESOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN – GRUPO A**

MARCA DEL ANIMAL	PESOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
	GRUPO A				
Cabeza	294	310	318	319	318
Dorso	295	299	308	299	308
Cola	297	314	316	312	311
Pata anterior derecha	295	299	307	310	296
Pata lado izquierdo	301	311	316	314	310
Patas delanteras	298	304	304	303	299
Patas posteriores	298	308	307	304	302
Patas cruzadas	300	305	304	302	300
Cabeza pata anterior derecha	297	310	315	317	320
Cabeza pata posterior derecha	302	308	316	320	322
Cabeza pata anterior izquierda	296	307	312	318	320
Cabeza pata posterior izquierda	300	313	317	320	323

*Fuente: Elaboración propia.*

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo A en el día basal**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	38	2	19	4.99270073	0.05142	4.25649473
Dentro de los grupos	34.25	9	3.80555556			
Total	72.25	11				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo A en el día 1**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	32.666	2	16.3333	0.64473684	0.54742	4.25649
Dentro de los grupos	228	9	25.333			
Total	260.666	11				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo A en el día 4**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	107.1666	2	53.5833	2.369778	0.14900	4.25649
Dentro de los grupos	203.5	9	22.6111			
<b>Total</b>	<b>310.666</b>	<b>11</b>				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo A en el día 10**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	351.5	2	175.75	5.17774	0.03187	4.25649
Dentro de los grupos	305.5	9	33.9444			
<b>Total</b>	<b>657</b>	<b>11</b>				

**Test de tukey respectivo al día 10 de experimentación**

Contraste	Diferencia	Límite	Resultado
RSV – BLM	4.25	5.75	No
RSV - blanco	8.75		si
BLM - blanco	13		si

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo A del día 14**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	722	2	361	9.7202	0.00564	4.25649
Dentro de los grupos	334.25	9	37.1388			
<b>Total</b>	<b>1056.25</b>	<b>11</b>				

**Test de tukey respectivo al día 14 de experimentación**

Contraste	Diferencia	Límite	Resultado
RSV – BLM	5.5	6.018	No
RSV - blanco	13		si
BLM - blanco	18.5		si

**ANEXO N° 9**

**PESOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN – GRUPO B**

MARCA DEL ANIMAL	PESOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN							
	GRUPO B							
Pata posterior derecha	298	318	318	313	315	320	320	330
Pata anterior izquierda	298	316	320	315	310	322	327	329
Pata posterior izquierda	299	309	318	316	310	322	324	333
Pata lado derecho	301	311	315	314	302	331	330	328
Cuatro patas	303	307	315	307	303	314	322	325
Cabeza – dorso	305	309	314	309	307	323	326	327
Dorso – cola	302	315	316	313	305	320	321	326
Cabeza – dorso – cola	308	319	315	311	295	326	321	330
Cola pata anterior derecha	295	308	310	325	328	326	325	327
Cola pata posterior derecha	300	310	315	320	322	323	329	335
Cola pata anterior izquierda	302	308	317	320	322	327	330	331
Cola pata posterior izquierda	299	309	314	316	320	328	327	329

*Fuente: Elaboración propia.*

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día basal**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	80.666	2	40.333	6.849	0.051	4.256
Dentro de los grupos	53	9	5.88			
Total	133.666	11				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 1**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	50.1666	2	25.083	1.5383	0.2662	4.256
Dentro de los grupos	146.75	9	16.305			
Total	196.916	11				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 5**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	30.166	2	15.083	3.331	0.0826	4.256
Dentro de los grupos	40.75	9	4.527			
Total	70.916	11				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 10**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	211.166	2	105.58	14.452	0.0015	4.2564
Dentro de los grupos	65.75	9	7.305			
Total	276.91	11				

**Test de tukey respectivo al día 10 de experimentación**

Contraste	Diferencia	Límite	Resultado
RSV – BLM	4.5	2.67	Si hay diferencia
RSV - blanco	5.75		Si hay diferencia
BLM - blanco	10.25		Si hay diferencia

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 15**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	873.166	2	436.583	19.097	0.00057	4.256
Dentro de los grupos	205.75	9	22.861			
Total	1078.91	11				

**Test de tukey respectivo al día 15 de experimentación**

Contraste	Diferencia	Límite	Resultado
RSV – BLM	6.75	7.012	No hay diferencia
RSV - blanco	13.75		Si hay diferencia
BLM - blanco	20.5		Si hay diferencia

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 20**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	55.5	2	27.75	1.50906	0.27216	4.25649
Dentro de los grupos	165.5	9	18.388			
<b>Total</b>	<b>221</b>	<b>11</b>				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 25**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	<b>55.1666</b>	<b>2</b>	<b>27.583</b>	<b>2.869</b>	<b>0.10860</b>	<b>4.2564</b>
Dentro de los grupos	86.5	9	9.6111			
<b>Total</b>	<b>141.666</b>	<b>11</b>				

**ANOVA de los pesos corporales de los subgrupos de experimentación pertenecientes al grupo B en el día 30**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	28.6666	2	14.333	2.047	0.1849	4.256
Dentro de los grupos	63	9	7			
<b>Total</b>	<b>91.666</b>	<b>11</b>				

ANEXO N°10

ANÁLISIS DE VARIANCA DE 1 VÍA DE LOS VALORES BASALES DE MDA EN LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B

Subgrupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
RSV GRUPO A	4	4.9159	1.2290	0.0053
BLM GRUPO A	4	4.9531	1.2383	0.0019
BLANCO GRUPO A	4	4.88	1.2200	0.0032
RSV GRUPO B	4	4.9372	1.2343	0.0070
BLM GRUPO B	4	4.9431	1.2358	0.0071
BLANCO GRUPO B	4	4.9342	1.2336	0.0021

Fuente: Elaboración propia.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00086	5	0.00017	0.0385	0.999	2.7729
Dentro de los grupos	0.08007	18	0.00445			
Total	0.08093	23				

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO N°11

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA EN SANGRE DE: MUESTRAS BASALES Y DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) PERTENECIENTES AL GRUPO A

Niveles de MDA del sub grupo resveratrol

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.9159	1.228975	0.005334309
día 1	4	5.9846	1.49615	0.00374419
día 7	4	6.6309	1.657725	8.27625E-05
día 14	4	7.5102	1.87755	0.000553803

Fuente: Elaboración propia.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.895754045	3	0.298584682	122.9367	2.832x10 <sup>-9</sup>	3.490294819
Dentro de los grupos	0.029145195	12	0.002428766			
Total	0.92489924	15				

*Fuente: Elaboración propia.*

### Niveles de MDA del sub grupo bleomicina

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.9531	1.238275	0.001927769
día 1	4	5.9799	1.494975	0.003482543
día 7	4	6.7671	1.691775	9.15092E-05
día 14	4	8.8567	2.214175	0.009079389

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.05281859	3	0.684272863	187.713602	2.398 x10 <sup>-10</sup>	3.490294819
Dentro de los grupos	0.04374363	12	0.003645303			
Total	2.09656222	15				

*Fuente: Elaboración propia.*

### Niveles de MDA del sub grupo blanco

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.88	1.22	0.003228667
día 1	4	5.1487	1.287175	0.001151429
día 7	4	5.0868	1.2717	0.003849727
día 14	4	5.1652	1.2913	0.000317293

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.012909712	3	0.004303237	2.01388977	0.1658	3.490294819
Dentro de los grupos	0.025641348	12	0.002136779			
Total	0.038551059	15				

*Fuente: Elaboración propia.*



**ANEXO N°12**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS NIVELES DE MDA EN SANGRE DE:**  
**MUESTRAS BASALES Y DIAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30)**  
**PERTENECIENTES AL GRUPO B**

**Niveles de MDA del sub grupo resveratrol**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.9372	1.2343	0.006990367
día 1	4	6.1169	1.529225	0.005209209
día 14	4	7.4267	1.856675	0.001732369
día 30	4	9.4419	2.360475	0.006691423

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.794616032	3	0.931538677	180.676347	$3.00 \times 10^{-10}$	3.490294819
Dentro de los grupos	0.061870103	12	0.005155842			
Total	2.856486134	15				

*Fuente: Elaboración propia.*

**Niveles de MDA del sub grupo bleomicina**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.9431	1.235775	0.007075503
día 1	4	5.9697	1.492425	0.004615429
día 14	4	9.149	2.28725	0.01276759
día 30	4	12.4127	3.103175	0.032206243

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.550647607	3	2.850215869	201.198463	$1.596 \times 10^{-10}$	3.490294819
Dentro de los grupos	0.169994293	12	0.014166191			
Total	8.720641899	15				

*Fuente: Elaboración propia.*

**Niveles de MDA del sub grupo blanco**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
día basal	4	4.9342	1.23355	0.002132737
día 1	4	5.2105	1.302625	0.000236783
día 14	4	5.2291	1.307275	0.000182729
día 30	4	5.2455	1.311375	0.000250576

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.016378457	3	0.005459486	7.79140652	0.0038	3.490294819
Dentro de los grupos	0.008408473	12	0.000700706			
Total	0.024786929	15				

*Fuente: Elaboración propia.*

**ANEXO N°13**

**ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS VÍAS DE: LOS NIVELES DE MDA EN MUESTRAS DE SANGRE BASALES, DE LOS DÍAS DE TRATAMIENTO (1,7 y 14) Y DE LOS SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO A**

RESUMEN	día basal	día 1	día 7	día 14	Total
<b>RSV GRUPO A</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.9159	5.9846	6.6309	7.5102	25.0416
Promedio	1.228975	1.49615	1.657725	1.87755	1.5651
Varianza	0.005334309	0.00374419	8.27625E-05	0.000553803	0.061659949
<b>BLM GRUPO A</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.9531	5.9799	6.7671	8.8567	26.5568
Promedio	1.238275	1.494975	1.691775	2.214175	1.6598
Varianza	0.001927769	0.003482543	9.15092E-05	0.009079389	0.139770815
<b>BLANCO GRUPO A</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.88	5.1487	5.0868	5.1652	20.2807
Promedio	1.22	1.287175	1.2717	1.2913	1.26754375
Varianza	0.003228667	0.001151429	0.003849727	0.000317293	0.002570071

<i>Total</i>				
Cuenta	12	12	12	12
Suma	14.749	17.1132	18.4848	21.5321
Promedio	1.229083333	1.4261	1.5404	1.794341667
Varianza	0.002921842	0.012812562	0.040689904	0.161344523

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	1.340654814	2	0.670327407	244.917	$1.09181 \times 10^{-21}$	3.259446306
Columnas	2.005210207	3	0.668403402	244.214	$5.61704 \times 10^{-24}$	2.866265551
Interacción	0.95627214	6	0.15937869	58.232	$4.62861 \times 10^{-17}$	2.363750958
Dentro del grupo	0.098530173	36	0.002736949			
Total	4.400667333	47				

*Fuente: Elaboración propia.*

#### Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo A en relación al día 1 de experimentación en la determinación de MDA

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.001	0.05218	No hay diferencia
RSV-blanco	0.210		Si hay diferencia
BLM-blanco	0.208		Si hay diferencia

#### Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo A en relación al día 7 de experimentación en la determinación de MDA

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.034	0.03616	No hay diferencia
RSV-blanco	0.386		Si hay diferencia
BLM-blanco	0.420		Si hay diferencia

#### Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo A en relación al día 14 de experimentación en la determinación de MDA

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.3372	0.05687	Si hay diferencia
RSV-blanco	0.5863		Si hay diferencia
BLM-blanco	0.9228		Si hay diferencia

**ANEXO N°14**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS VÍAS DE: LOS NIVELES DE MDA EN MUESTRAS DE SANGRE BASALES, DE LOS DÍAS DE TRATAMIENTO (1,14 y 30) Y DE LOS SUBGRUPOS PERTENECIENTES AL GRUPO B**

RESUMEN	día basal	día 1	día 14	día 30	Total
<b>RSV GRUPO A</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.9372	6.1169	7.4267	9.4419	27.9227
Promedio	1.2343	1.529225	1.856675	2.360475	1.74516875
Varianza	0.006990367	0.005209209	0.001732369	0.00669142	0.190432409
<b>BLM GRUPO B</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.9431	5.9697	9.149	12.4127	32.4745
Promedio	1.235775	1.492425	2.28725	3.103175	2.02965625
Varianza	0.007075503	0.004615429	0.01276759	0.03220624	0.581376127
<b>BLANCO GRUPO B</b>					
Cuenta	4	4	4	4	16
Suma	4.9342	5.2105	5.2291	5.2455	20.6193
Promedio	1.23355	1.302625	1.307275	1.311375	1.28870625
Varianza	0.002132737	0.000236783	0.000182729	0.00025058	0.001652462
<b>Total</b>					
Cuenta	12	12	12	12	
Suma	14.8145	17.2971	21.8048	27.1001	
Promedio	1.234541667	1.441425	1.817066667	2.25834167	
Varianza	0.004418734	0.013498671	0.179469362	0.60010241	

*Fuente: Elaboración propia.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	4.470922955	2	2.235461478	334.938	$5.44909 \times 10^{-24}$	3.259446306
Columnas	7.300456971	3	2.433485657	364.608	$5.51523 \times 10^{-27}$	2.866265551
Interacción Dentro del grupo	4.061185125	6	0.676864188	101.414	$4.77678 \times 10^{-21}$	2.363750958
Total	0.240272868	36	0.006674246			
	16.07283792	47				

*Fuente: Elaboración propia.*

**Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo B en relación al día 1 de experimentación en la determinación de MDA**

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.0468	0.05718	No hay diferencia
RSV-blanco	0.2266		Si hay diferencia
BLM-blanco	0.1898		Si hay diferencia

**Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo B en relación al día 14 de experimentación en la determinación de MDA**

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.4306	0.05718	Si hay diferencia
RSV-blanco	0.5494		Si hay diferencia
BLM-blanco	0.98		Si hay diferencia

**Test de tukey de los subgrupos pertenecientes al grupo B en relación al día 30 de experimentación en la determinación de MDA**

CONTRASTE	DIFERENCIA	LÍMITE	RESULTADO
RSV-BLM	0.7427	0.11281	Si hay diferencia
RSV-blanco	1.0491		Si hay diferencia
BLM-blanco	1.7918		Si hay diferencia

**ANEXO N°15**

**ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN DEL MÉTODO DE ASHCROFT EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMONES PERTENECIENTES A LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B**

**TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
resveratrol 14A	4	9.4	2.35	0.196666667
bleomicina 14 A	4	13	3.25	0.063333333
blanco 14 A	4	2.6	0.65	0.01
resveratrol 30 B	4	14.75	3.6875	0.117291667
bleomicina 30 B	4	25.8	6.45	0.09
blanco 30 B	4	2	0.5	0.066666667

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	97.70552083	5	19.54110417	215.543	2.1018 x10 <sup>-15</sup>	2.7728
Dentro de los grupos	1.631875	18	0.090659722			
Total	99.33739583	23				

*Fuente: Elaboración propia.*

**ANEXO N°16**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ESCALA DE PUNTUACIÓN DEL MÉTODO**  
**DE ASHCROFT EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMONES**  
**PERTENECIENTES A LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN A Y B**

**TINCIÓN DE TRICÓMICO DE MASSON**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
RSV14A	4	9.8	2.45	0.063333333
BLM14A	4	15	3.75	0.17
blanco 14A	4	2	0.5	0.013333333
RSV30B	4	12.6	3.15	0.036666667
BLM30B	4	19.8	4.95	0.836666667
blanco30B	4	2.2	0.55	0.036666667

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	63.08833333	5	12.61766667	65.451	$6.5301 \times 10^{-11}$	2.7728
Dentro de los grupos	3.47	18	0.19277778			
Total	66.55833333	23				

*Fuente: Elaboración propia.*