



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

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

TESIS

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INHALADA DE SURFACTANTE
PULMONAR PORCINO Y FOSFATIDILETANOLAMINA SOBRE UN MODELO
MURINO DE FIBROSIS PULMONAR**

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

PRESENTA

MARÍA ISABEL MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

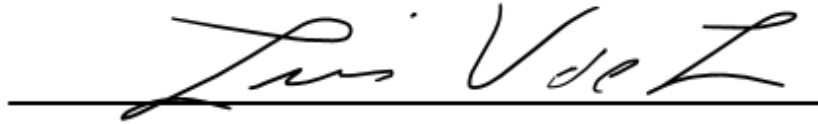
DIRECTORES DE TESIS

D. C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS

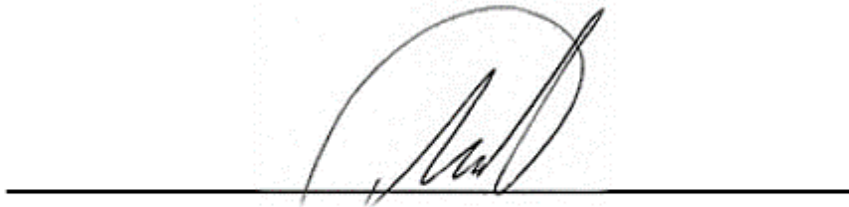
D. C. MARIO GARCÍA CARRASCO

PUEBLA, PUE.

NOVIEMBRE 2020



D. C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS




D. C. MARIO GARCÍA CARRASCO



MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN



D. C. MAURA CÁRDENAS GARCÍA



M. C. TERESITA ROMERO OGAWA



M. C. BEATRIZ TLATELPA ROMERO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vázquez De Lara, por brindarme conocimiento, paciencia y confianza.

A mis compañeros de maestría, por la amistad, la solidaridad y los buenos momentos.

Al Laboratorio de Medicina Experimental, por brindarme amistad y conocimiento.

Al CONACYT y al CONCYTEP por la aportación que hizo sido posible este proyecto.

DEDICATORIAS

A Dios, por ser un padre amoroso.

A mis padres Felicitas y Gerardo, por el regalo de la existencia y por proveerme los medios para recorrer el camino de la vida.

A mi esposo Isaac, por ser motor, fuerza, ánimo, mi fuente de confianza y nunca dejar de creer en mí.

A mis hermanas y hermanos, por sus consejos y su apoyo incondicional.

RESUMEN

Introducción: La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal; caracterizada por el deterioro del parénquima pulmonar; debido a la lesión persistente; lo que altera la arquitectura y función normal del pulmón, generando focos de fibrosis. La esperanza de vida de quienes la padecen es de 3-5 años desde el inicio de los síntomas. Se cuenta con evidencia de que beractante, un surfactante comercial en combinación de la fosfatidiletanolamina (PE), inducen un fenotipo antifibrosante en fibroblastos de pulmón humano normal, así como en un modelo animal de fibrosis pulmonar. El beractante tiene un alto costo, por ello y debido al potencial terapéutico del que se tiene registro, nos interesa desarrollar y probar un surfactante pulmonar porcino enriquecido con PE, que pueda ser usado en humanos con patologías fibrosantes de pulmón o deficiencia de surfactante pulmonar. **Objetivo:** Determinar el efecto de la administración inhalada de SPP y SPP-PE en el modelo murino de fibrosis pulmonar. **Metodología:** empleamos ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 y formamos cuatro grupos experimentales: control negativo, control positivo, SPP-PE y SPP, los dos primeros fueron tratados con solución salina y a los dos restantes se les administró SPP-PE y SPP. Pasados 21 días se sacrificaron y se les extrajeron los pulmones, el pulmón izquierdo se conservó en formol amortiguado al 10% para su procesamiento y tinción con tricrómico de Masson para su posterior análisis histológico, la cuantificación de colágena presente en el tejido se efectuó en el programa *Orbit Image Analysis*. **Resultados:** el SPP y su combinación con PE (SPP-PE), demostraron reducir la fibrosis pulmonar inducida mediante bleomicina $p < 0.001$; la comparación entre los tratamientos SPP y SPP-PE no presentó diferencia estadísticamente significativa. **Conclusión:** la terapia de SPP y SPP-PE atenúan la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, por lo cual puede desarrollarse un surfactante de menor costo que pueda ser probado en patologías fibrosantes.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	4
TABLA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	5
CAPÍTULO 1	7
1. ANTECEDENTES GENERALES	7
Fibrosis Pulmonar Idiopática	7
Surfactante Pulmonar	11
Fosfatidiletanolamina	14
Modelo animal de FP inducida por Bleomicina	14
Patología digital	15
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	17
Surfactante y enfermedades pulmonares	17
Uso terapéutico del surfactante y la fosfatidiletanolamina	18
CAPÍTULO 2	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	19
5. JUSTIFICACIÓN	20
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS	21
7.1 Diseño del estudio	21
7.2 Ubicación espacio - temporal	21
7.3 Marco muestral	21
7.4 Criterios de selección	21
7.5 Definición de variables	21
7.6 Metodología general (para todos los objetivos)	22
7.7 Análisis estadístico	31
8. RESULTADOS	32
Cuantificación de Hidroxiprolina	32

Estandarización del modelo de aprendizaje automatizado para cuantificación de colágena	33
Cuantificación de colágena con el modelo de aprendizaje automatizado	37
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIÓN	43
CAPÍTULO 3.....	44
11. LIMITACIONES.....	44
12. FORTALEZAS	44
13. PERSPECTIVAS A FUTURO	44
14. BIBLIOGRAFÍA	45
15. ANEXOS	50
Tabla de variables.....	50
Infraestructura física y humana	50
Aspectos éticos.....	51
Técnicas de laboratorio	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SURFACTANTE PULMONAR PORCINO	22
FIGURA 2. MODELO EXPERIMENTAL	23
FIGURA 3. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS EN AEROSOL	24
FIGURA 4. TRATAMIENTOS SPP-PE Y SPP PARA LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	25
FIGURA 5. LAMINILLAS CON TINCIONES H&E Y TRICRÓMICO DE MASSON	26
FIGURA 6. PULMÓN DE RATÓN PULVERIZADO.	27
FIGURA 7. FOTOGRAFÍAS DE LAS MEDICIONES CON EL MODELO DESARROLLADO CON ORBIT IMAGE ANALYSIS	28
FIGURA 8. CALENDARIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS	30
FIGURA 9. CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIPROLINA.	33
FIGURA 10. FOTOGRAFÍAS DE CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÓN DE RATÓN.	34
FIGURA 11. MICROFOTOGRAFÍA DE TEJIDO PULMONAR PROCESADA EN ORBIT	35
FIGURA 12. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO TOTAL PRESENTE EN EL TEJIDO PULMONAR	35
FIGURA 13. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA PERIBRONQUIAL CON EL MODELO DESARROLLADO CON ORBIT IMAGE ANALYSIS	36
FIGURA 14. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA PERIVASCULAR CON EL MODELO DESARROLLADO CON ORBIT IMAGE ANALYSIS	36
FIGURA 15. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA TOTAL EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	38
FIGURA 16. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA PERIBRONQUIAL EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	39
FIGURA 17. CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA PERIVASCULAR EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DATOS BIOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LOS TENSOACTIVOS ACTUALES DE ORIGEN ANIMAL.....	13
TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	30
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	32
TABLA 4. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	37
TABLA 5. VARIABLES DE MEDICIÓN.....	50

TABLA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

EPI	Enfermedades pulmonares intersticiales
NII	Neumopatías intersticiales difusas
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
MEC	Matriz extracelular
BMP	Proteína morfogénica ósea
RER	Retículo endoplásmico rugoso
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
AECI	Célula epitelial alveolar tipo I
AECII	Célula epitelial alveolar tipo II
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
SP	Surfactante pulmonar
SPP	Surfactante pulmonar porcino
LB	Cuerpos lamelares
SP-A	Proteína del surfactante A
SP-B	Proteína del surfactante B
SP-C	Proteína del surfactante C
SP-D	Proteína del surfactante D
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
FL	Fosfolípidos
PG	Fosfatidilglicerol

PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatilinositol
PS	Fosfatidilserina
SM	Esfingomielina
UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales
VM	Ventilación mecánica
SDR	Síndrome de dificultad respiratoria
BALF	Fluido de lavado broncoalveolar
Bleo	Bleomicina
SFB	Suero fetal bovino
H&E	Tinción con hematoxilina y eosina
TM	Tinción tricrómico de Masson
Hyp	Hidroxirolina

CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES GENERALES

Fibrosis pulmonar idiopática

Definición

Las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) representan un grupo de entidades heterogéneas de comportamiento variable, pero con características clínicas, funcionales y radiológicas semejantes; son alteraciones que se caracterizan por cursar con inflamación y fibrosis; al progresar muestran rasgos cicatrízales lo cual imposibilita diferenciar sus características específicas (Buendía, 2015). Un subgrupo de enfermedades de este tipo son las neumopatías intersticiales idiopáticas (NII); las cuales fueron clasificadas y definidas en 2002 por la American Respiratory Society y la European Respiratory Society (American Thoracic Society & European Respiratory Society, 2002). En 2013 se realizó una actualización catalogando nuevas entidades patológicas y clasificando en tres grupos a las NII (Travis et al., 2013), ahora se reconocen a las a) enfermedades crónicas fibrosantes, b) enfermedades relacionadas con el tabaco y c) las NII agudas o subagudas (Hashisako, 2015).

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) pertenece a las NII crónico-fibrosantes, representando el 55%, su diagnóstico es multidisciplinario ya que requiere la integración de la información clínica, radiográfica e histológica (Mejía et al., 2016).

La FPI es una enfermedad progresiva e irreversible de origen desconocido, de mal pronóstico, con una tasa de mortalidad del 50% calculada a los 3-5 años después del diagnóstico. Entre los síntomas frecuentes se encuentran disnea, tos persistente y estertores crepitantes (Aburto, 2018).

Epidemiología

En México la FPI está considerada como entidad patológica poco frecuente, pero es la más importante y común dentro de las NII, además de ser una de las tres causas más comunes de morbilidad y mortalidad, según el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Barreto-Rodríguez, 2015). Pocos son los estudios enfocados en su epidemiología, la tasa global anual de prevalencia reporta entre 14 y 43 casos por cada 100 000 habitantes (Buendía, 2013). En los últimos años se ha observado incremento a nivel mundial; debido quizá a la

optimización de los métodos diagnósticos y al aumento de la esperanza de vida. El rango de edad para el desarrollo de FPI se estima entre los 55 y 75 años. En México no se cuenta con información epidemiológica, pero tomando en consideración que la esperanza de vida pasó de los 65 a los 75 años en este siglo, se espera que los casos aumenten en los próximos años (Hashisako, 2015).

Patogenia

A pesar de que la patogénesis de la FPI no está claramente integrada, muchos estudios sugieren que factores de riesgo como el envejecimiento, el tabaquismo, el reflujo gastroesofágico, la predisposición genética y factores epigenéticos son importantes para el desencadenamiento de esta patología (Bouros, 2013). A continuación, se exponen los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la FPI.

Factores ambientales: en general el proceso de envejecimiento contribuye a que se presente inestabilidad genómica, pérdida de las funciones protectoras de los telómeros, cambios epigenéticos, pérdida de proteostasis, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y alteración de la comunicación intercelular (Taskar, 2006; Yang, 2015). La senescencia de células epiteliales induce fibrosis pulmonar a través del patrón secretor anormal del epitelio pulmonar y el aumento de la resistencia a la apoptosis de los miofibroblastos (Betensley, 2016).

Factores genéticos: la susceptibilidad a FPI se relaciona con una serie de variantes genéticas y cambios transcripcionales que resultan en pérdida de la integridad epitelial y disfunción del surfactante pulmonar (Proteína C) (Savani et al., 2001; Sgalla et al., 2018). Se ha identificado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen MUC5B (rs35705950); asociado fuertemente con FPI familiar y esporádica; se especula que promueve la hipersecreción y acumulación de moco en el espacio aéreo periférico, mecanismo que induce y potencia la inflamación crónica y la aparición de lesiones (Schwartz, 2016).

Factores epigenéticos: el término epigenética se refiere a los cambios que sufre el genoma que no implican modificaciones en su secuencia de nucleótidos, pero que involucran reorganizaciones de éste, dichos mecanismos pueden presentarse como metilaciones del ADN o modificaciones postraduccionales en las histonas. Estos cambios permiten que las células expresen genes específicos y transfieran la información a las células hijas (Moosavi, 2016). El

tabaquismo induce cambios en el epigenoma, modulando la expresión de genes relacionados con la FPI (Schwartz, 2016). Se han realizado estudios que indican que la metilación del ADN produce modificaciones transcripcionales presentes en el parénquima pulmonar de pacientes con FPI, dichos cambios involucran genes similares expresados en formas diferentes; los cuales están asociados a la síntesis, degradación y señalización en la matriz extracelular (MEC), marcadores para α -actina de musculo liso, factores de crecimiento, activación de vías del desarrollo y en la respuesta inmune innata (Schwartz, 2016).

Activación de vías del desarrollo: existen vías importantes de comunicación celular que durante el desarrollo embrionario activan o reprimen la expresión de genes necesarios para la proliferación y diferenciación celular; las cuales en la vida extrauterina participan en la homeostasis de los tejidos, regulando la proliferación y activación de células madre (Chen et al., 2016). Estas vías incluyen, la vía de señalización Wnt, vía Hedgehog (SHH), vía de señalización Notch y la señalización por proteína morfogénica ósea (BMP), ellas determinan la comunicación célula-célula, la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células; éstas pueden activarse como respuesta a la reparación normal de la lesión pulmonar, pero su activación perpetua, desregulada y no coordinada conduce a cicatrización y aumento del proceso fibrótico en la fibrosis pulmonar idiopática (Fernández, 2012).

La teoría actual sobre el origen de la FPI señala al envejecimiento epitelial como factor responsable de la senescencia celular y del desequilibrio entre la demanda en la síntesis de proteínas y la capacidad del retículo endoplásmico rugoso (RER) para funcionar adecuadamente (López-Otín, 2013; Xu et al., 2009) Lo anterior resulta en la activación de la vía de “respuesta a proteínas desplegadas” (UPR, por sus siglas en inglés) que inhibe la traducción de proteínas y conduce a la activación de vías apoptóticas, estimulando la producción de mediadores profibróticos (Tanjore, 2012). La microlesión repetida del epitelio alveolar en pacientes con FPI produce una reparación alterada en la que las células desarrollan comportamientos aberrantes, creando un desequilibrio entre los mediadores profibróticos y antifibróticos lo que se traduce en el desarrollo y mantenimiento del proceso fibrótico (Sgalla et al., 2018).

Ante la lesión y pérdida de células alveolares epiteliales tipo I (AECI), el epitelio pulmonar reacciona induciendo la proliferación y diferenciación de células alveolares epiteliales tipo II (AECII), que restauran la integridad de la membrana basal desencadenando mecanismos de la cascada de coagulación, angiogénesis, activación y migración de fibroblastos (King Jr, 2011). En las fases iniciales de la cicatrización se producen citocinas para estimular la respuesta inflamatoria y la transición hacia la reparación de los tejidos, reclutando fibroblastos, células epiteliales y endoteliales; cuando la lesión persiste, se reclutan neutrófilos y monocitos, éstos producen factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un importante mediador profibrótico (Todd, 2012). Otros factores involucrados en los mecanismos de reparación son el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Sgalla et al., 2018).

Existe evidencia de que la lesión de las células epiteliales induce la expresión de α -actina de músculo liso (α SMA) y los fibroblastos activados mediante TGF- β 1 producen colágeno tipo I y tipo III (Sakai, 2013).

Normalmente la matriz extracelular (MEC) está compuesta por fibras colágenas tipo I y III en proporción de 2:1 aproximadamente; elastina, laminina y colágeno tipo IV; en la FPI esta composición muestra el aumento de colágeno tipo I y III en las fases tempranas, predominando el colágeno tipo III en los tabiques engrosados del intersticio pulmonar y colágeno tipo I en las áreas cicatrizales, éste último representa aproximadamente el 80% del colágeno pulmonar total (Glasser et al., 2016).

La activación de factores profibróticos conlleva a la deposición excesiva de matriz extracelular (MEC), principalmente secretada por los fibroblastos acumulados en diferentes zonas del pulmón; esta respuesta reparadora provoca la contracción y rigidez de la MEC; lo cual tiene consecuencias en la función pulmonar, ya que impide la expansión elástica y contracción pulmonar, durante los ciclos respiratorios y evita el intercambio gaseoso eficiente (Hinz, 2012; Sakai, 2013).

Tratamiento farmacológico

Los avances en el conocimiento de la patogenia de la fibrosis pulmonar han cambiado el rumbo de la terapéutica, antes el tratamiento farmacológico era a base de glucocorticoides e inmunomoduladores, actualmente el objetivo es la inhibición del proceso fibrótico (Xaubet, 2013) Los fármacos usados actualmente son:

Pirfenidona: fármaco antiinflamatorio y antifibrótico, el cual actúa inhibiendo la síntesis de proteínas profibróticas y citocinas (Xaubet, 2013). Su eficacia clínica ha sido evaluada en ensayos clínicos fase III, controlados, aleatorizados y doble ciego en pacientes de Europa, Estados Unidos (ensayos CAPACITY) y Japón. Los resultados de los ensayos CAPACITY mostraron que 2.4 mg de pirfenidona durante 24 h reducen la progresión de la enfermedad en un 30 %, sin embargo no resulta eficaz en todos los casos y tiene efectos secundarios frecuentes como fotosensibilidad, mareos, molestias digestivas y alteraciones en la función hepática (Noble, 2011; Xaubet, 2013).

Nintedanib: es un inhibidor de tirosina cinasa que actúa sobre los receptores para factores de crecimiento PDGF, VEGF, FGF (Richeldi, 2014). Se ha estudiado su efecto en ensayos clínicos fase II y se ha demostrado que reduce la pérdida de la función respiratoria, enlenteciendo la progresión de la enfermedad leve-moderada y las exacerbaciones de la enfermedad (Richeldi, 2014).

Surfactante Pulmonar

Los surfactantes son agentes de superficie que disminuyen la tensión superficial, la cual se define como la fuerza de atracción cohesiva experimentada por las moléculas presentes en la interfase de dos medios (sólido-líquido, líquido-líquido o líquido-gas); la tensión superficial tiende a empujar las moléculas en la interfase hacia adentro, reduciendo así la interacción entre dos fases (Perez-Gil, 2010).

El SP es un complejo de lípidos y proteínas que contribuye a estabilizar las paredes alveolares reduciendo la tensión superficial durante el ciclo respiratorio; además juega un papel importante en la inmunidad pulmonar innata (Olmeda, 2017).

El intercambio de gases entre el aire y el torrente sanguíneo se lleva a cabo en los alveolos pulmonares, lo cual conlleva un trabajo físico y mecánico constante; por ello es esencial la presencia del surfactante pulmonar (SP) (Perez-Gil, 2010) . Los surfactantes forman

una película entre los dos medios de tal manera que sus interacciones son termodinámicamente estables y dan como resultado una tensión superficial reducida (Akella, 2013). El SP tiene como función primaria facilitar la mecánica respiratoria durante los ciclos de inspiración y espiración (Pérez-Gil, 2010). El cambio drástico en el área de superficie de los alvéolos a lo largo del ciclo respiratorio establece que la tensión de la superficie alveolar debe ser inferior a 2 mN/m al final de la espiración para evitar el colapso alveolar; el surfactante genera una película que produce una tensión superficial extremadamente baja (<1 mN/m), lo que permite la resistencia a la compresión, experimentada durante la respiración (Han, 2015).

Las células encargadas de la síntesis del SP con los neumocitos tipo II; son células cuboidales que cubren aproximadamente el 5% del área de la superficie alveolar, se encuentran ubicadas en las esquinas de los alvéolos pulmonares; dentro de ellas se encuentran los cuerpos lamelares (LB) en los cuales se almacena el SP (Akella, 2013). La secreción del surfactante al medio extracelular se lleva a cabo vía exocitosis mediante una fusión entre la membrana de los neumocitos tipo II y la membrana de los LB en respuesta a señales extracelulares (Agassandian, 2013).

El SP se compone de fosfolípidos, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos, además de contener proteínas específicas denominadas SP-A, SP-B, SP-C, SP-D. La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) es el fosfolípido principal y representa el 80% de los lípidos del surfactante. El segundo fosfolípido abundante es el fostatidilglicerol (PG) que representa el 15% aproximadamente; los demás forman el 5% de los fosfolípidos y son fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) (Han, 2015). Las proteínas interactúan con los fosfolípidos regulando la estructura y las propiedades de la película lipídica; las proteínas SP-B y SP-C son proteínas hidrófobas, su papel principal es la regulación y estabilidad de la película del surfactante, SP-A y SP-D son hidrófilas, están involucradas en la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria; la proteína SP-D también se encuentra involucrada en la homeostasis pulmonar (Agassandian, 2013).

Surfactantes exógenos

A partir de la década de 1980 se han empleado surfactantes exógenos para tratar el síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido (SDR); los primeros tensoactivos empleados fueron de origen porcino y bovino; esto debido a que el surfactante pulmonar de

los mamíferos tiene similitudes en su composición química y por lo tanto puede usarse como sustituto en el pulmón humano (Hentschel, 2020). Existen dos tipos de surfactantes: los de origen animal y los sintéticos. Los tensoactivos de origen animal se recolectan mediante lavado o picado de tejido pulmonar porcino o bovino, seguido de centrifugación; dichas preparaciones difieren en composición y concentración de fosfolípidos y proteínas; lo que les confiere propiedades farmacológicas y bioquímicas diferentes, en la Tabla 1 se muestran los principales tensoactivos de origen animal disponibles en el mercado.

Tabla 1. Datos bioquímicos y farmacológicos de los tensoactivos actuales de origen animal.

Origen	Nombre bioquímico (comercial)	Método de preparación	FL totales (mg/mL)	FL principal	SP-B (mg/mL)	SP-C (mg/mL)	Dosis (mg/mL)	Volumen (mL/kg)
Bovino	Beractante (Survanta®)	Pulmón picado enriquecido	25	DPPC 70% y PS 4%	0.03	0.3	100	4
	BLES (Neosurf o Liposurf®)	Lavado de pulmón	27	DPPC 42% y PG 11%	0.17	0.49	135	5
	Bovactante (Alveofact®)	Lavado de pulmón	45	DPPC 39% y PG 8.5%	0.3	0.7	50	1.2
	Calfactante (Infasurf®)	Lavado de pulmón	35	DPPC 41% y PG 6%	0.26	0.36	105	3
	Surfactante pulmonar inyectable (Kelisu®) [§]	Lavado de pulmón	30	DPPC 48% y otros	0.2	0.25	100	3.3
	Surfactante TA (Surfacten®)	Pulmón picado enriquecido	25	DPPC 65% y otros	-	-	120	4.8
Porcino	Butantan [§]	Pulmón picado	25	DPPC 76% y PE 7%	*	*	100	4

Poractante- α (Curosurf®)	Pulmón picado modificado	80	DPPC 46% y PE 6%	0.45	0.9	100 o 200	1.25 ó 2.5
Surfacen [§]	Lavado de pulmón	25	DPPC 45% y PI 12%	≠	≠	100	4

§ Kelisu, Butantan y Surfacen son tensoactivos comercializados solo en China, Brasil y Cuba, respectivamente. - No hubo más detalles disponibles para este tensoactivo. * Las proteínas B y C en Butantan representan del 5 al 10% del total.

≠ Todas las proteínas tensoactivas de Surfacen representan el 1% del total. Obtenida de: (Tridente, 2019)

Los tensoactivos sintéticos son mezclas de lípidos libres de proteínas, motivo por el que hasta el momento tienen efectos inferiores a los tensoactivos de origen animal, ya que son incapaces de adsorberse en la interfase alveolar aire-líquido; actualmente *Lucinactante*, un tensoactivo sintético de tercera generación al cual se le añadieron proteínas, está en pruebas preclínicas; sin embargo, hasta el momento los tensoactivos de origen animal han demostrado tener una acción más rápida y más eficiente que los sintéticos (Hentschel, 2020).

Fosfatidiletanolamina

La fosfatidiletanolamina es un fosfolípido (PE) presente en las membranas plasmáticas, en ellas tiene la capacidad de formar curvaturas y con ello aumentar la actividad de algunas proteínas; forma parte del SP, interactuando con las proteínas SP-B y SP-C al facilitar la adsorción del SP en la interfase aire-agua dentro del alveolo pulmonar (Chavarha, 2010; Raja, 2011; Tuck, 2011). En una célula viable, la PE se encuentra en mayor concentración en la parte citosólica de la membrana; dentro de sus funciones está la activación de los mecanismos de apoptosis; ya que la PE y PS son translocadas por flipasas a la superficie de la membrana plasmática, constituyendo así un marcador activador de la vía de muerte celular (Vance, 2008).

Modelo animal de FP inducida por Bleomicina

La base para el empleo de modelos animales en la investigación de los mecanismos fibrogénicos es la similitud estructural, bioquímica y molecular entre la reacción fibrótica en humanos y animales. La experimentación en animales es el único procedimiento que permite valorar en tiempo real el efecto de las interacciones genéticas, bioquímicas y medioambientales que provoca la fibrosis pulmonar (Molina, 2007).

El modelo de bleomicina se considera el método más eficaz, reproducible y consistente para inducir fibrosis pulmonar e investigar la FPI (Peng, 2013).

La bleomicina es un antineoplásico, producido por la bacteria *Streptomyces verticillus*; su uso en modelos animales para inducir fibrosis se basa en el hecho de que la fibrosis pulmonar es uno de los principales efectos adversos de la bleomicina en el tratamiento del cáncer humano; su mecanismo de acción se basa en provocar roturas en el ADN de las células interrumpiendo su ciclo celular, así como por producir de forma excesiva especies reactivas de oxígeno, lo cual conduce a una respuesta inflamatoria que causa toxicidad pulmonar, activación de fibroblastos y fibrosis (Benítez, 2006).

Los pulmones, carecen de la enzima hidrolasa de bleomicina, la cual causa inactivación de dicho fármaco; situación que los hace más susceptibles a la lesión tisular inducida por este medicamento. Los ratones de la cepa C57BL/6 son el modelo animal que ha mostrado mayor susceptibilidad a la lesión pulmonar, después de la administración de bleomicina de forma intratraqueal (Benítez, 2006).

Patología digital

El término patología digital se refiere al uso de herramientas informáticas para ver imágenes digitales de portaobjetos completos, obtenidas del escaneo en alta resolución de un portaobjetos de vidrio (Williams, 2017). El uso de esta tecnología permite identificar, extraer y cuantificar las características de los tejidos con mayor detalle (Pell, 2019).

El análisis de imágenes proporciona una cuantificación más reproducible de la morfología, cantidad de tejido y componentes relevantes de los tejidos; el aprendizaje basado en algoritmos digitales permite crear modelos complejos a partir de datos y así construir algoritmos que superan las capacidades de los métodos tradicionales de análisis de imagen (Pell, 2019). Los archivos digitales tienen la ventaja de ser reutilizables y ser usados para fines didácticos, de diagnóstico o investigación; su uso en experimentos científicos ha demostrado una precisión única y ha permitido cuantificar componentes que antes no era posible, además de que permite realizar mediciones en secciones de tejido, evitando así el sesgo del cerebro humano (Wielenga & Vainer, 2012).

La inteligencia artificial (IA) se basa en el aprendizaje; con ella se han identificado nuevos marcadores de metástasis a distancia en el cáncer colorrectal y características estromales asociadas con la supervivencia en el cáncer de mama; los métodos de aprendizaje automático pueden facilitar una evaluación cuantitativa precisa de imágenes digitales a un nivel

de rendimiento que potencialmente excede al de los observadores humanos; la identificación de células cancerosas, tejido estromal o células inflamatorias requiere típicamente conjuntos de datos de entrenamiento precisos (Pell, 2019).

Existen distintos programas comercializados para análisis de imagen y otros más de código libre como *QuPath Open Source Software*, *ImageJ* u *Orbit Image Analysis* que ha demostrado un rendimiento equivalente al de expertos humanos en la interpretación de exploraciones de tomografía de coherencia óptica; por lo que hay mucho interés en utilizar estas tecnologías en ensayos clínicos (Pell, 2019).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Surfactante y enfermedades pulmonares

El tensoactivo pulmonar fue descubierto en la década de 1950, a partir de entonces se ha estudiado. Desde 1980 se emplea para tratar el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en bebés prematuros, ya que demostró mejorar la mortalidad y la necesidad de ventilación en los recién nacidos de bajo peso al nacer (Hentschel, 2020).

El papel que juega el surfactante en la fisiopatogenia de la FPI no está bien determinado; se ha observado que la disminución en la función del surfactante se asocia a una serie de enfermedades como el SDR, la proteinosis alveolar pulmonar, las enfermedades pulmonares obstructivas, EPI y la enfermedad pulmonar crónica (Griese, 1999; Moreno-Galdó, 2017). Las enfermedades pulmonares obstructivas, enfermedades pulmonares crónicas y EPI la deficiencia de surfactante es secundaria a anomalías inflamatorias o metabólicas; la sarcoidosis, la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad son algunas de las enfermedades pulmonares intersticiales asociadas con la disminución del surfactante y se caracterizan por dificultad respiratoria, infiltración pulmonar y funcionamiento anormal de los pulmones (Moreno-Galdó 2017). Se sabe que en la FPI el contenido de fosfolípidos del surfactante se encuentra disminuido (Akella, 2013).

Mahavadi y cols en 2014 realizaron un experimento *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales les indujeron FP mediante amiodarona; posteriormente midieron el daño al tejido pulmonar y la propiedad tensoactiva del surfactante pulmonar, para ello analizaron el contenido del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de cada modelo experimental; el análisis mostró una reducción significativa en la cantidad de DPPC, así como PC y PG; el análisis de las proteínas tensoactivas SP-B y SP-C no mostró diferencias significativas, sus conclusiones son que el surfactante sufrió alteraciones debidas a eventos relacionados con estrés celular por parte de los neumocitos tipo II (Mahavadi, 2014).

Uso terapéutico del surfactante y la fosfatidiletanolamina

En el Laboratorio de Medicina Experimental de la FMBUAP, se ha demostrado que el surfactante pulmonar promueve la apoptosis de los fibroblastos de pulmón humano normal (NHLF), induce la regulación positiva de la matriz metaloproteinasa-1 y la regulación descendente del colágeno tipo I (Vázquez De Lara, 2000); dicha respuesta se genera al inducir una señal de Ca^{2+} ; beractante utiliza la vía entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) para ejercer su efecto proapoptótico y antifibrinógeno sobre los NHLF (Guzmán-Silva, 2015); además existe evidencia de que el surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina mejora la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en un modelo murino (Vazquez De Lara, 2018). El estudio evaluó el efecto de tres fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar sobre fibroblastos pulmonares humanos normales; los fosfolípidos fueron DPPC, PG y PE; considerando las proporciones habituales de lípidos reportados en el surfactante pulmonar, se usó DPPC, PG y PE; no se observó ningún efecto con DPPC ni PG; la PE mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la apoptosis de fibroblastos, con respecto al control (Vazquez De Lara, 2018).

Dado que la PE reduce la expresión de colágeno en el fibroblasto *in vitro*, Vázquez De Lara y cols, examinaron si la PE tenía el mismo efecto sobre el desarrollo de fibrosis pulmonar *in vivo*; para este propósito, se expuso a un grupo de ratones a bleomicina y la respuesta fibrótica pulmonar se analizó a los 21 días (Vazquez De Lara et al., 2018). El surfactante enriquecido con PE disminuyó la inflamación pulmonar y la fibrosis inducida por la bleomicina. El efecto sobre la respuesta fibrótica fue corroborado por el análisis semicuantitativo del índice fibrótico, este hallazgo fue consistente con la cuantificación de colágena. Los ratones con bleomicina casi duplicaron la concentración de colágeno en los pulmones cuando se compararon con el grupo control (99.2 ± 8.1 versus $49.1 \pm 16.9 \mu\text{g/ml}$; $p < 0.05$). El tratamiento con SP disminuyó la concentración de colágena, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. El tratamiento de los ratones con PE y con surfactante enriquecido con PE mostró una disminución significativa en la acumulación de colágena en el pulmón (Vazquez De Lara et al., 2018).

CAPÍTULO 2

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fibrosis pulmonar idiopática se considera una enfermedad progresiva y mortal; caracterizada por presentar una cicatrización aberrante como respuesta a la lesión constante del epitelio alveolar. Hasta el momento no tiene cura y el manejo farmacológico actual no consigue frenarla ni mejorar la supervivencia, ya que los pacientes con FPI tienen una esperanza de vida de 3 a 5 años después del diagnóstico.

El surfactante pulmonar es esencial para el intercambio de gases que se lleva a cabo en los alveolos pulmonares, además juega un papel importante en la inmunidad pulmonar.

Estudios previos en el laboratorio de Medicina Experimental han demostrado que el surfactante pulmonar y la fosfatidiletanolamina poseen un efecto antifibrosante en fibroblastos de pulmón humano *in vitro* e *in vivo* en un modelo experimental de FP. La realización de dichos experimentos se ha llevado a cabo con un surfactante comercial (Beractant) y PE, sin embargo, la terapia tiene un costo muy elevado, por lo que pretendemos generar un surfactante exógeno proveniente de pulmón de cerdo (SPP) y enriquecerlo con PE para evaluar su efecto en un modelo de FP y comprobar si dicho efecto es similar a los resultados obtenidos previamente.

Por ello surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la administración inhalada de surfactante porcino y fosfatidiletanolamina en un modelo murino de fibrosis pulmonar?

4. HIPÓTESIS

La administración inhalada de surfactante pulmonar porcino y fosfatidiletanolamina tendrán efecto en el modelo murino de fibrosis pulmonar.

5. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la BUAP, se cuenta con evidencia del efecto antifibrosante que tiene el surfactante y la fosfatidiletanolamina, un fosfolípido presente en el surfactante pulmonar.

Con la realización de este experimento esperamos que el SPP y su enriquecimiento con PE tengan efecto antifibrosante, y con ello sentar las bases para el desarrollo de un surfactante enriquecido con PE de bajo costo que pueda ser probado en seres humanos con patologías como las relacionadas con deficiencia de surfactante, así como en patologías fibrosantes como las neumopatías intersticiales difusas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la administración inhalada de SPP y SPP-PE en el modelo murino de fibrosis pulmonar.

6.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: aislar el surfactante pulmonar porcino (SPP).

Objetivo específico 2: determinar el efecto del SPP a 400 mg/kg sobre la concentración de colágena en el modelo experimental.

Objetivo específico 3: determinar el efecto de la combinación de SPP a 400 mg/kg con PE a 0.75 mg/ml, sobre la concentración de colágena en el modelo experimental.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Realizamos un estudio comparativo, experimental, transversal, prolectivo y homodémico.

7.2 Ubicación espacio - temporal

El estudio se realizó en el Laboratorio de Medicina Experimental de la FMBUAP, en el periodo comprendido de agosto de 2018 a julio de 2020.

7.3 Marco muestral

Para el cálculo del tamaño de muestra, se empleó como variable blanco la concentración de colágena. Para que el resultado sea relevante, definimos el valor de la magnitud del efecto (en ANOVA es la medida de dispersión entre los grupos relativa a la dispersión dentro de los grupos) en 0.7, ya que en los experimentos previos esto fue lo que se observó con la concentración de colágena; en donde esperamos el menor cambio en relación con el control. Con una probabilidad de cometer el error tipo 1 de 0.05 y una potencia del 80%, se necesitan 7 ratones por grupo para demostrar dicho efecto. Para los cálculos empleamos el programa estadístico SamplePower (IBM) versión 3.0.1. En nuestra experiencia tenemos una mortalidad de alrededor del 30% en los ratones tratados con bleomicina, por lo que se emplearon 10 ratones por grupo.

7.4 Criterios de selección

Ratones de la cepa C57BL/6

Machos

De 8 a 10 semanas de vida

Peso de 20 a 25 g

Criterios de eliminación

Ratones muertos durante la cirugía o el período de terapia.

7.5 Definición de variables

Variable dependiente: fibrosis pulmonar.

Variable independiente: surfactante pulmonar y fosfatidiletanolamina.

7.6 Metodología general (para todos los objetivos)

Aislamiento del surfactante pulmonar porcino

El tensioactivo se obtuvo de pulmones de cerdo (Figura 1) recolectados con previa autorización en el rastro municipal del Estado de Puebla. A cada par de pulmones se le realizaron en promedio tres lavados a través de la tráquea con solución salina. El líquido obtenido se centrifugó a 2,000x g a una temperatura de 4° C durante cinco minutos para eliminar desechos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 12,500 x g por 30 minutos a 4° C. El botón obtenido se resuspendió en solución salina y se extrajeron los fosfolípidos mediante solubilidad diferencial. Se concentró la fase clorofórmica y se precipitaron los fosfolípidos con acetona fría. La concentración de fosfolípidos se estimó a partir del peso seco de la pastilla posterior a la extracción con acetona. El botón formado se llevó a sequedad en ambiente de nitrógeno y se resuspendió en solución salina 100 mM con cloruro de calcio 5 mM a una concentración de 25 mg/ml de fosfolípidos.



Figura 1. Surfactante pulmonar porcino. El tensioactivo empleado en el experimento se obtuvo mediante lavados broncoalveolares de pulmón de cerdo, posteriormente fue centrifugado y se conservó en refrigeración hasta la administración de los tratamientos.

Preparación del modelo de fibrosis pulmonar

La bleomicina es un medicamento utilizado para el tratamiento del cáncer; dentro de sus efectos secundarios están que causa neumonitis y fibrosis pulmonar por lo cual se utiliza para inducir fibrosis en modelos experimentales (Benítez, 2006).

Para el modelo experimental se emplearon ratones macho adultos de entre 8 y 10 semanas de edad, de la cepa C57BL/6 con un peso promedio de 20 a 25 g. Se usó esta cepa

debido a su susceptibilidad a la fibrosis inducida por bleomicina. Los ratones fueron obtenidos del bioterio Claude Bernard de la BUAP, previa aceptación del protocolo por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, siguiendo los lineamientos de la norma NOM 062-ZOO-1999, para el manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales.

Antes de la administración de bleomicina, los ratones fueron anestesiados de forma intraperitoneal con ketamina y xilacina a una dosis de 0.10 ml/10g de peso. Se utilizó alcohol etílico para humedecer el tórax y el abdomen del animal para lograr que el pelo se uniera a la piel y así evitar contaminación. Posteriormente se realizó un corte epitelial a nivel de la tráquea, se removió el músculo que la recubre con pinzas iris; se pasó aire a 0.05 ml para limpiar las vías aéreas y se procedió a la administración de bleomicina de forma intratraqueal a una dosis de 7U/kg, con una jeringa de 1ml; al terminar se suturó el tejido.

Los controles negativos fueron sometidos al mismo procedimiento, pero en lugar de bleomicina, se administró solución salina en la misma dosis que la bleomicina.

Pasados 21 días desde la administración de bleomicina se procedió al sacrificio por medio de exanguinación del modelo experimental. Se recolectaron los dos pulmones, uno se puso en formol amortiguado al 10% para su estudio histopatológico y el otro se congeló a -20° C para cuantificar la cantidad de colágeno por el método de hidroxiprolina.

Todos los ratones fueron etiquetados mediante una muesca en la oreja de acuerdo con el método AALAS (Animal Care and Use in Research and Education) (Figura 2).

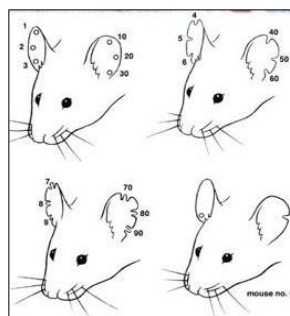


Figura 2. A. Modelo experimental. Grupo de ratones de la cepa C57BL/6. **B. Método AALAS para muesqueo de ratones.** Los ratones se asignaron de forma aleatorizada al grupo experimental correspondiente, y se les hicieron muescas para su reconocimiento.

Técnica para la administración de tratamientos

La administración del tratamiento se realizó por vía inhalada en aerosol, empleando la técnica descrita por Sun y cols., (Sun et al., 2009) ya que ha demostrado que esta vía es efectiva.

Para la aplicación de SPP y PE en aerosol, se empleó un micronebulizador (PARI LC Star) que genera partículas de 2 a 5 μm las cuales son lo suficientemente pequeñas para llegar a los alvéolos pulmonares.

Las dosis para micronebulizar el surfactante y surfactante con PE se diluyeron con 1 ml de solución salina, posteriormente se colocó en el receptáculo del micronebulizador.

Los ratones se colocaron dentro de un tubo falcón (Figura 3), en cual podían tener respiraciones normales sin métodos invasivos. El tubo se conectó al micronebulizador y el tratamiento se nebulizó con un flujo de oxígeno de 4 L/min.



Figura 3. Administración de tratamientos en aerosol. El ratón se introdujo en un tubo falcón de 50 mL al cual se le cortó la punta; a través del orificio resultante, la nariz del ratón estuvo en contacto con el tratamiento inhalado.

Preparación de fosfatidiletanolamina

Se utilizó PE (Sigma Aldrich, No. Catálogo P7693-100 mg) almacenada a -20°C , se disolvieron 100 mg de PE en 5 mL de cloroformo obteniéndose una concentración de 20 mg/mL. Se hicieron alícuotas de 1 mL, que se almacenaron a -70°C .

Preparación del surfactante.

Los ratones se pesaron y se sumaron sus pesos para preparar la cantidad total de surfactante empleado en cada tratamiento. Empleamos un surfactante porcino obtenido de lavados de pulmón de cerdo, a una dosis de 400 mg/kg. Se colocó en el micronebulizador la dosis para cada modelo experimental de acuerdo con su peso y se llevó a un volumen de 1 mL con solución salina al 0.9%.

Preparación de surfactante enriquecido con fosfatidiletanolamina.

Los ratones se pesaron y se sumaron los pesos para preparar la cantidad total de surfactante enriquecido con PE para el tratamiento. El surfactante que se empleó fue el obtenido de los lavados de pulmón de cerdo, del cual con base a estudios previos tomamos una concentración de 25 mg de fosfolípidos por ml (Figura 4). Se calculó la cantidad total de PE en relación con el volumen de surfactante empleado. Se tomó la cantidad necesaria de PE disuelta en cloroformo, se colocó en un tubo estéril de 15 ml y se evaporó en ambiente de nitrógeno. Una vez evaporado el cloroformo, se añadió el volumen de surfactante porcino calculado para el experimento. La mezcla se sonicó a una amplitud del 75% por 5 minutos con pulsos de 20 segundos. Se colocó en el micronebulizador la dosis para cada unidad experimental de acuerdo con su peso y se llevó a un volumen de 1 ml con solución salina.

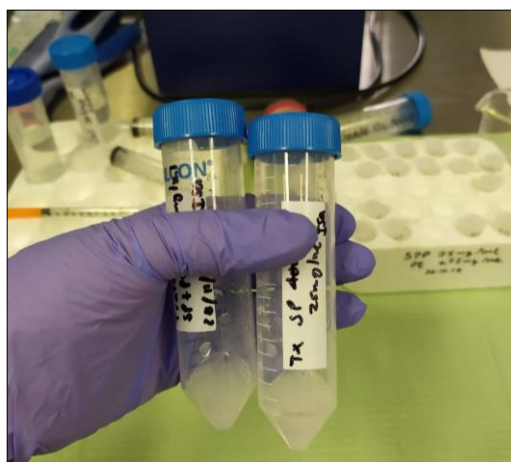


Figura 4. Tratamientos SPP-PE y SPP para los grupos experimentales. Previo a la aplicación de los tratamientos, estos se llevaron a un volumen de 1 mL de solución salina y se agitaron para garantizar su homogeneidad.

Procesamiento de las muestras

El pulmón izquierdo fue disecado y puesto en formol amortiguado al 10% para su análisis histopatológico. Las muestras de tejido pulmonar fueron cortadas, deshidratadas e incluidas en parafina, posteriormente se realizaron cortes de 3 a 5 μm para posteriormente teñirse con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson, dicho procedimiento se realizó en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la BUAP. El pulmón derecho se congeló a -20°C para cuantificar la cantidad de colágeno por el método de hidroxiprolina.

Análisis histopatológico

Obtuvimos un total de 60 laminillas provenientes de los 4 grupos de ratones grupo I (control negativo – pulmón sano), grupo II (control positivo - pulmón fibrótico), grupo III (bleo tratado con SPP – pulmón fibrótico en tratamiento) y grupo IV (bleo tratado con SPP-PE – pulmón fibrótico en tratamiento) (Figura 5); con todas ellas se cuantificó la cantidad de colágena en el tejido, por medio de fotografías tomadas en microscopio mediante el programa *Motic Image Plus*, para su posterior procesamiento con el software *Orbit Image Analysis*.

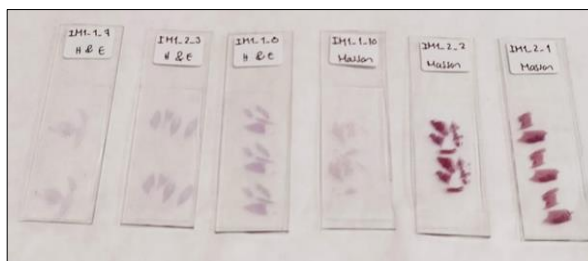


Figura 5. Laminillas con tinciones H&E y tricrómico de Masson. Se procesaron y tiñeron las muestras para su posterior análisis histológico.

Cuantificación de Hidroxiprolina

Antes de comenzar con la extracción de colágena, se pesaron los pulmones en una balanza analítica. El pulmón fue colocado en hielo seco para después ser pulverizado, el tejido se recolectó en un tubo de vidrio con tapa, se agregaron 500 μL de HCl 6N a cada muestra, finalmente se colocaron las muestras en el horno a 110°C durante la noche (Figura 6).

Se colocaron 100 μL de cada muestra en un tubo eppendorff y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 min. En una placa de lectura de 96 pozos se colocó 1 μL de cada muestra y se realizó una curva estándar de hidroxiprolina utilizando la solución estándar de trabajo de

0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las muestras y la curva patrón se realizaron por triplicado, posteriormente la placa se colocó en un termoblock a 80°C durante 15 min (hasta que el líquido se evaporó). Después a cada muestra se le agregaron 100 μL de cloramina T y se dejó a temperatura ambiente, durante 30 min. Pasado el tiempo establecido se agregaron 100 μL de reactivo de Ehrlich y se cubrió con una lámina de plástico, se llevó a 65°C en termoblock durante 30 min. Posteriormente se procedió a realizar la lectura en un lector de placas de ELISA a 550 nm.



Figura 6. A. Pulmón de ratón pulverizado. Para la medición de Hyp el pulmón se pulveriza en hielo seco. **B. Pulmón preparado con HCl 6N.** Una vez preparado se pone a secar 10 días para su posterior medición mediante espectrofotometría.

Análisis de imágenes con el programa Orbit Image Analysis

Orbit Image Analysis es un programa de código libre, útil para el análisis de imágenes de diferentes tejidos; esto lo logra mediante algoritmos que utilizan el aprendizaje automatizado, basado en un modelo de entrenamiento. El programa procesa imágenes a través de 4 módulos: clasificación de tejidos, modelo de exclusión, segmentación de objetos y clasificación de objetos. El módulo “clasificación de tejidos” permite hacer la discriminación de las regiones de interés en una imagen. El módulo “modelo de exclusión” permite clasificar la imagen en regiones que pueden ser de inclusión o de exclusión, logrando un análisis detallado y preciso de las zonas de interés, excluyendo el fondo de la imagen. El módulo “segmentación de objetos” permite detectar elementos en la imagen y describirlos con una forma, habitualmente se usa para segmentar células. El módulo “clasificación de objetos” permite sumar a la segmentación, la clasificación de todos los objetos detectados, es decir clasifica objetos segmentados. La finalidad del programa es crear un algoritmo confiable, válido y consistente, para la cuantificación de colágena presente en las microfotografías del modelo experimental.

Para desarrollar el algoritmo de cuantificación; una patóloga experta seleccionó 5 fotografías con clara ausencia de fibrosis pulmonar y otras 5 claramente fibróticas; como parámetro adicional se tomó en cuenta la cantidad de tinción que absorbió cada laminilla, ya que esto podía afectar la coloración visible en la misma; se eligieron fotografías con distintos tipos de coloración, con la finalidad de que la medición fuera exacta y que el programa detectara todas las variaciones de color. Se establecieron los criterios de medición ya que deseábamos conocer la cantidad total de colágena, así como la cantidad presente alrededor de los bronquios y vasos con la finalidad de detectar realmente una diferencia cuando ésta existiera (Figura 7). Posteriormente se generaron varios modelos, los cuales fueron entrenados y puestos a prueba; seleccionamos el modelo que demostró detectar la diferencia cuando realmente existía, con dicho modelo se procedió al análisis del total de las microfotografías, siguiendo el mismo proceso de medición para cada una.

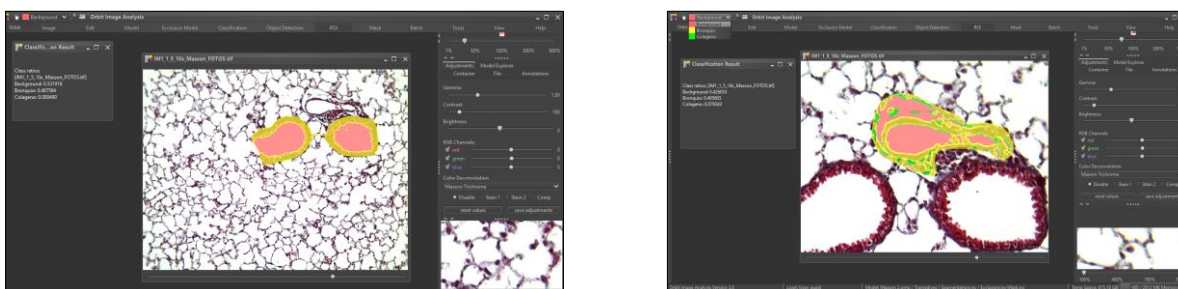


Figura 7. Fotografías de las mediciones con el modelo desarrollado con Orbit Image Analysis. A. Los colores rojo y amarillo muestran que el modelo es capaz de discriminar la región de interés para medición, que en este caso son los bronquios presentes en la fotografía. **B.** Medición de la región de interés iluminada: vasos presentes en la fotografía.

Metodología para cada objetivo específico

Objetivo específico 1: aislar el surfactante pulmonar porcino.

Fundamento lógico: en el laboratorio se cuenta con la evidencia de que el SP produce un fenotipo antifibrosante en modelos *in vivo* e *in vitro*. Para probar el efecto del surfactante pulmonar porcino realizamos lavados broncoalveolares a pulmones de cerdo, con la finalidad de obtener el tensoactivo.

Metodología: Después de aislar el SPP (pág. 21) se repartió en muestras alícuotas en viales estériles de 4 ml y se almacenó a 4° C.

Objetivo específico 2: determinar el efecto del SPP a 400 mg/kg sobre la concentración de colágena en el modelo experimental.

Fundamento lógico: en el laboratorio se cuenta con evidencia de que el SP produce un fenotipo antifibrosante en fibroblastos de pulmón humano *in vitro* y en un modelo murino de fibrosis pulmonar. Esperamos que el SPP tenga el mismo efecto sobre la concentración de colágena en los modelos experimentales.

Metodología: se formó un grupo experimental al cual se le administró bleomicina y fue tratado con SPP a una dosis de 400 mg/kg (Tabla 2). La administración del tratamiento se realizó 30 min después de la instilación con bleomicina, posteriormente se suministraron 3 dosis cada 48 h; las 2 últimas dosis se administraron cada 72 h, para completar un total de 6 dosis (Figura 8). Los ratones se sacrificaron el día 21, por medio de exanguinación. El pulmón izquierdo se usó para el análisis histopatológico y el pulmón derecho se utilizó para la medición de colágena por medio del método de hidroxiprolina.

Objetivo específico 3: determinar el efecto de la mezcla de SP 400 mg/kg con PE a 0.75 mg/ml, sobre la concentración de colágena, en el modelo experimental.

Fundamento lógico: en el laboratorio se cuenta con evidencia de que el SP y la PE producen un fenotipo antifibrosante en fibroblastos de pulmón humano *in vitro* y en un modelo murino de fibrosis pulmonar. Esperamos que el SPP-PE tenga el mismo efecto sobre la concentración de colágena en los modelos experimentales.

Metodología: se formó un grupo experimental al cual se le administró bleomicina y fue tratado con SPP-PE a una dosis de 400 mg/kg – 0.75 mg/ml, respectivamente (Tabla 2); la dosis de PE representa el 3% de PE presente en el surfactante de forma habitual. El día 21 se extrajeron los pulmones para realizar las mediciones correspondientes. La administración del tratamiento se realizó 30 min después de la instilación con bleomicina, posteriormente se suministraron 3 dosis cada 48 h; las 2 últimas dosis se administraron cada 72 h, para completar un total de 6 dosis (Figura 8).

Tabla 2. Distribución de los grupos experimentales.

Grupos experimentales	Tratamiento	Condición pulmonar
Control positivo	Sol. salina -Sol. salina 0.9%	Sano
Control negativo	Sol. salina 0.9% - Bleo [•]	Fibrótico
SPP-PE	Bleo - SPPPE	Fibrótico - Tx [†]
SPP	Bleo - SPP	Fibrótico - Tx

•Bleo bleomicina, [†]Tx en tratamiento

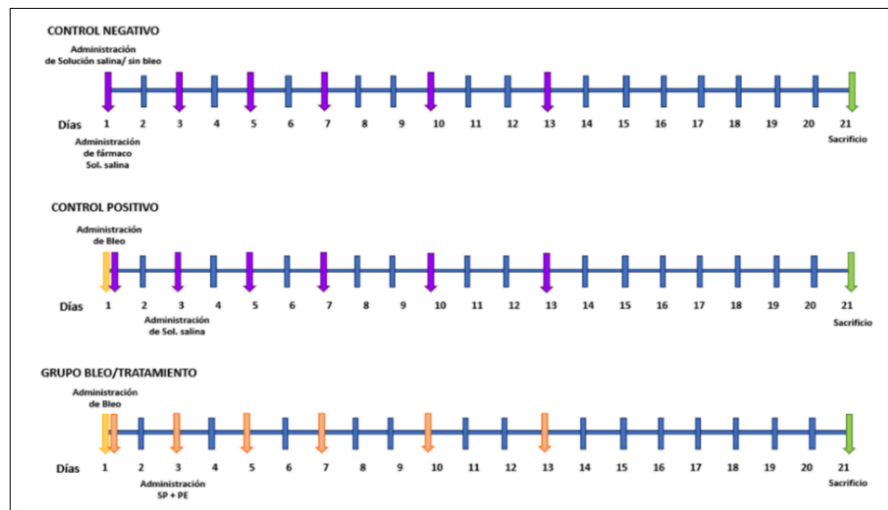


Figura 8. Calendario de la administración de tratamientos. A todos los grupos se les administraron un total de 6 dosis de SPP o SPP-PE, la primera fue el mismo día de la instilación de solución salina o bleomicina, tres dosis restantes se administraron cada 48 h y las dos restantes cada 72 h.

7.7 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se reportan en medidas de tendencia central y de dispersión para cada grupo de ratones. El análisis se realizó con el software R versión 3.6.3. Para comparar la diferencia entre los grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, ya que los datos no tienen una distribución normal; posteriormente se realizó un *post hoc* de Nemenyi para múltiples comparaciones no paramétricas entre pares de grupos. Los hallazgos se consideraron significativos con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

Después del aislamiento el SPP obtenido de lavados broncoalveolares de pulmones de cerdo (pág. 21), se repartió en muestras alícuotas en viales estériles de 1 ml y almacenó a 4° C. Algunos viales se enriquecieron con PE a 0.75 mg/mL y se almacenaron hasta la fase de tratamiento.

Las unidades experimentales fueron asignadas a los grupos experimentales correspondientes mediante un ensayo de Bernoulli (control negativo, control positivo, tratamiento 1, tratamiento 2), una vez formados los grupos, se procedió a la realización del experimento y posterior administración de tratamientos (control negativo – solución salina, control positivo – solución salina, tratamiento 1 – SPP-PE, tratamiento 2 – SPP).

Las características descriptivas de cada grupo experimental se encuentran en la Tabla 3. El día uno de experimento tras la instilación intratraqueal de solución salina o bleomicina, se inició con el tratamiento asignado a cada grupo experimental. Pasados veintiún días, se realizó el sacrificio de los ratones y la disección de los pulmones, las muestras del pulmón izquierdo se conservaron en formol amortiguado al 10% para su procesamiento y posterior análisis histológico.

Tabla 3. Características del modelo experimental.

Grupo	No. ratones	Edad (sem)	Peso (g)
Control negativo	10	8	24.4 \bar{x} , \pm 2.3
Control positivo	10	8	23.7 \bar{x} , \pm 2.1
SPP-PE	5	8	24.0 \bar{x} , \pm 1.8
SPP	5	8	23.1 \bar{x} , \pm 2.4

sem Semanas, \bar{x} Promedio, \pm DE

Cuantificación de Hidroxiprolina

La colágena está conformada por tres cadenas α , una de esas cadenas está constituida por una secuencia única de aminoácidos (Gly-X-Y), en la cual la X está ocupada por la prolina y en la posición Y encontramos a la hidroxiprolina (Hyp). La Hyp es un aminoácido que constituye aproximadamente el 10% de la molécula de colágena y se encuentra de forma exclusiva en este tipo de proteína; por ello es posible usarla para determinar cuantitativamente

la colágena presente en un tejido. En la Figura 9 se observa que existe una diferencia significativa $p < 0.05$ entre la cantidad de colágena presente en el tejido pulmonar del grupo control negativo y el control positivo; ya que este último generó 40.6% más colágena con respecto al control negativo.

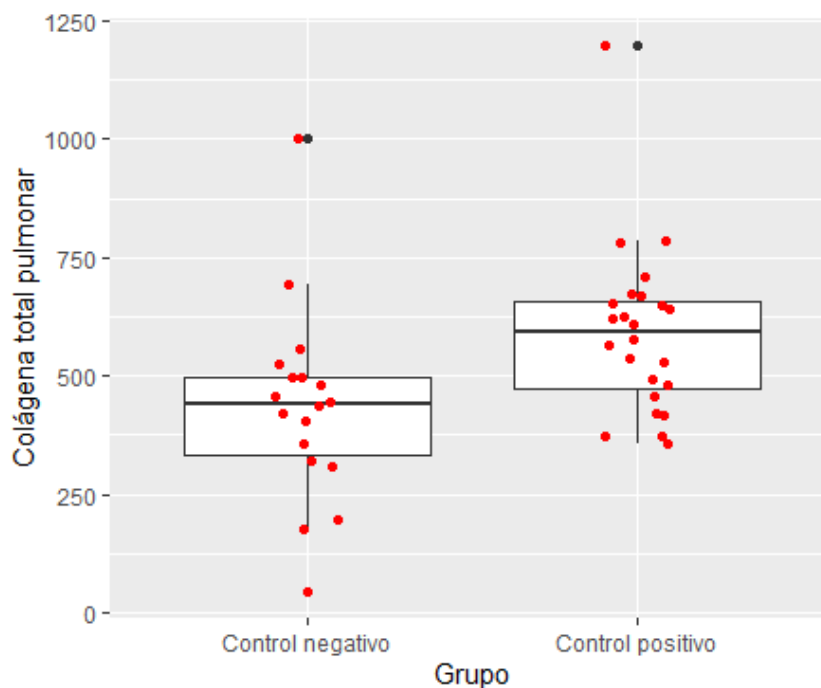


Figura 9. Cuantificación de hidroxiprolina (Hyp). Hidroxiprolina presente en el tejido pulmonar de los grupos control negativo y control positivo empleando espectrofotometría, existe diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ entre los grupos.

Estandarización del modelo de aprendizaje automatizado para cuantificación de colágena

Empleando *Orbit Image Analysis*, un programa de aprendizaje automatizado de código libre, el cual identifica colores, formas y patrones; cuantificamos la colágena presente en el tejido pulmonar examinado. El programa utiliza imágenes y requiere de entrenamiento por parte del usuario para reconocer las estructuras a medir.

Las microfotografías del tejido a analizar fueron tomadas con ayuda del microscopio marca *LEICA CME*, la cámara digital *Moticam 2300* y el programa *Motic Image Plus* versión 2.0 NC, con el cual se procesaron y guardaron las fotografías tomadas en aumento 10x. En la Figura 10, se observan las fotografías correspondientes a la tinción de Tricrómico de Masson.

Para el entrenamiento de *Orbit* y la creación del modelo de cuantificación de colágena presente en el tejido utilizamos imágenes representativas de pulmón sano y fibrótico. El patólogo experto eligió 5 fotografías al azar, de los grupos control negativo (pulmón sano) y positivo (pulmón claramente fibrótico), con distintas variaciones de color con la finalidad de desarrollar con modelo capaz de detectar la colágena (teñida en azul), presente en el tejido teñido con Tricrómico de Masson.

Para generar el modelo, se le enseñó a *Orbit* cada estructura presente en la fotografía (por color y forma), se le asignó un nombre y un color, con el cual fuera sencillo identificarla una vez realizada la medición, además, con la función ROI (regiones de interés) se seleccionaron áreas específicas como bronquios y vasos para que éstas fueran medidas por separado (Figura 11).

Cada fotografía se procesó 3 veces, la primera vez se cuantificó el colágeno total presente en el tejido, en los siguientes procesamientos se seleccionaron áreas o regiones de interés (ROI), así cuantificamos el área relativa de colágena total, colágena perivascular y peribronquial, ya que esta se encuentra de forma habitual en el tejido sano.

La Figura 12 muestra el resultado obtenido de la medición realizada por nuestro modelo, resultando una diferencia significativa $p < 0.05$. Las figuras Figura 9 y Figura 12 resultan muy parecidas, ya que muestran diferencias significativas entre los grupos, con ello concluimos que nuestro modelo es capaz de identificar la diferencia existente entre los tejidos. En las figuras Figura 13 y Figura 14 observamos que, aunque existe una cantidad de colágena alrededor de bronquios y vasos en el tejido sano, ésta se encuentra aumentada en el tejido fibrótico ($p < 0.05$).

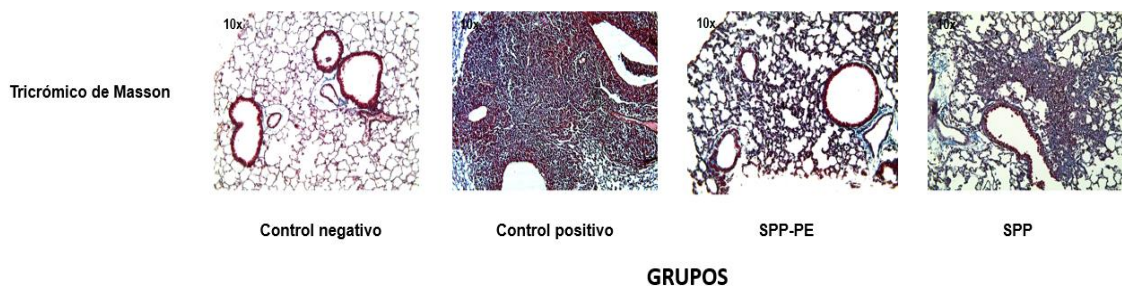


Figura 10. Fotografías de cortes histológicos de pulmón de ratón. Secciones de tejido pulmonar teñido con tricrómico de Masson. El colágeno se tiñe de azul y los núcleos celulares de rojo. A: Tejido pulmonar sano. B: Tejido pulmonar fibrótico. C y D: Tejido pulmonar con fibrosis reducida.

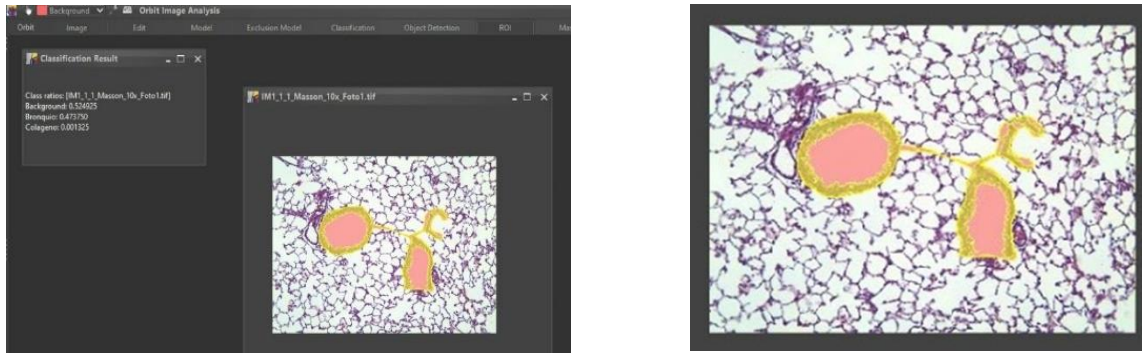


Figura 11. Microfotografía de tejido pulmonar procesada en Orbit. Con el modelo diseñado se realizó la medición de la colágena presente en el tejido pulmonar; los colores muestran el área de medición.

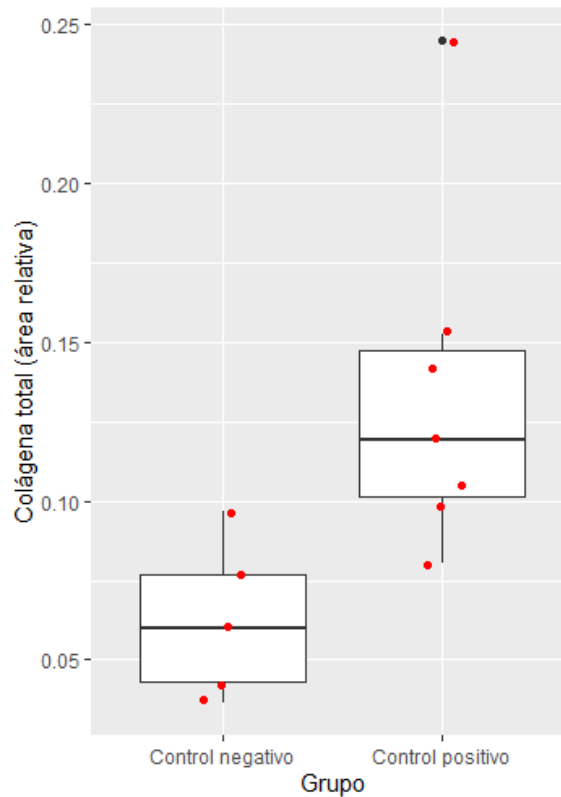


Figura 12. Cuantificación de colágeno total presente en el tejido pulmonar de ratones con (control positivo) y sin (control negativo) FP, medida con Orbit Image Analysis. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena dentro del tejido pulmonar, la gráfica muestra una diferencia significativa $p < 0.05$.

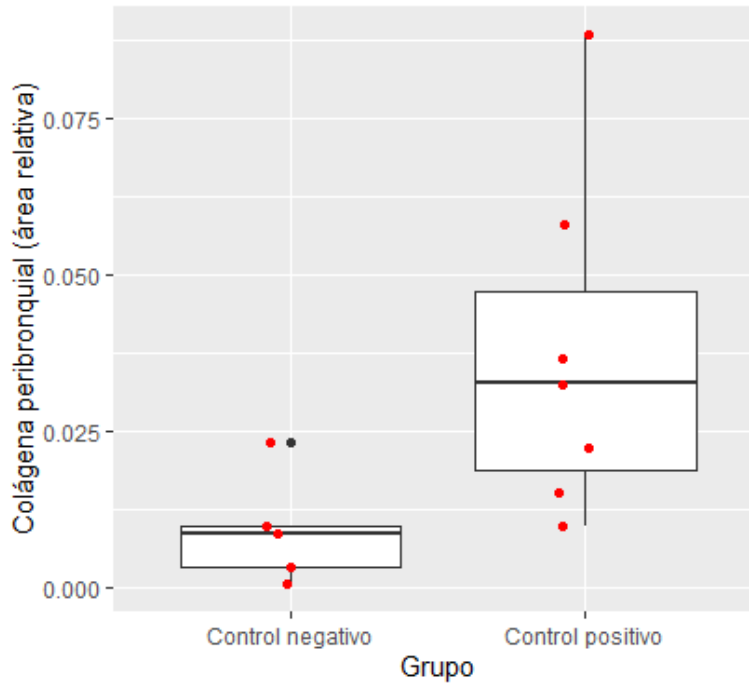


Figura 13. Cuantificación de colágena peribronquial con el modelo desarrollado con *Orbit Image Analysis*. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena alrededor del bronquio, la gráfica muestra una diferencia significativa $p < 0.05$.

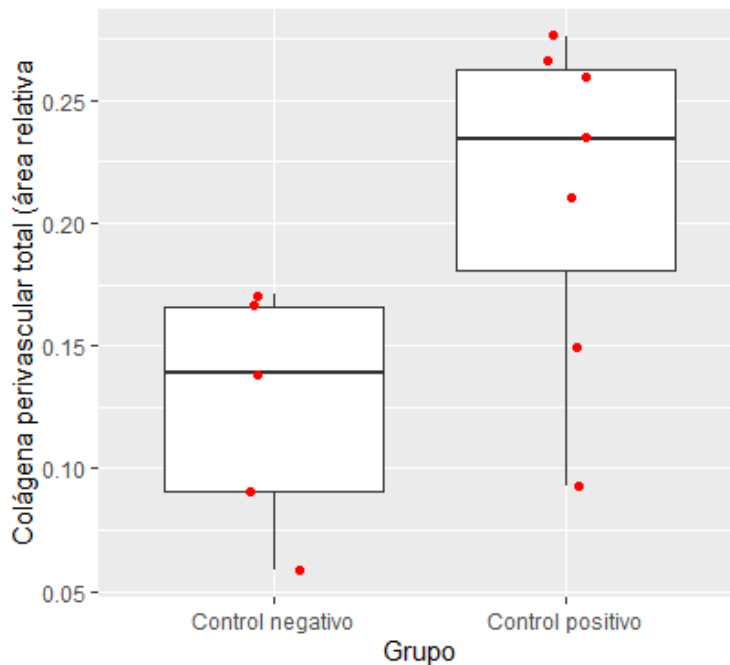


Figura 14. Cuantificación de colágena perivascular con el modelo desarrollado con *Orbit Image Analysis*. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena alrededor del vaso, las gráficas muestran una diferencia significativa $p < 0.05$.

Cuantificación de colágena con el modelo de aprendizaje automatizado

Una vez diseñado, entrenado y estandarizado el modelo de medición, procedimos al procesamiento del total de las microfotografías (n= 465) del tejido pulmonar obtenido durante el experimento.

La medición se realizó de forma cegada ya que se seleccionó un grupo de fotografías sin la participación del investigador que realizó la medición.

Se realizaron un total de tres mediciones por fotografía, la estadística descriptiva se muestra en la Tabla 4. Los valores representan el área relativa. El modelo de FP inducida mediante bleomicina fue capaz de generar fibrosis pulmonar en el modelo experimental, ya que el grupo control positivo tuvo mayores cantidades de colágena (mediana 0.116 e intervalo intercuartílico 0.076-0.168) con respecto a los demás grupos. Las figuras Figura 15, Figura 16 y Figura 17, muestran la diferencia encontrada mediante la prueba de Kruskal- Wallis y un *post hoc* de Nemenyi entre el grupo control positivo y los grupos tratados con SPP-PE y SPP $p < 0.001$. Sin embargo, no hallamos diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos empleados en el experimento.

Tabla 4. Estadística descriptiva de los grupos experimentales.

Grupo	Colágena total	Colágena bronquial	Colágena vascular
Control negativo	0.063° [0.037 - 0.096]*	0.007° [0.003 - 0.022]*	0.064 [0.033 - 0.126]*
Control positivo	0.116° [0.076 - 0.168]*	0.024° [0.008 - 0.066]*	0.110 [0.055 - 0.212]*
SPP-PE	0.071° [0.061 - 0.092]*	0.012° [0.006 - 0.025]*	0.074 [0.047 - 0.114]*
SPP	0.073° [0.058 - 0.093]*	0.008° [0.004 - 0.014]*	0.086 [0.046 - 0.126]*

° Mediana, *Variación intercuartílica

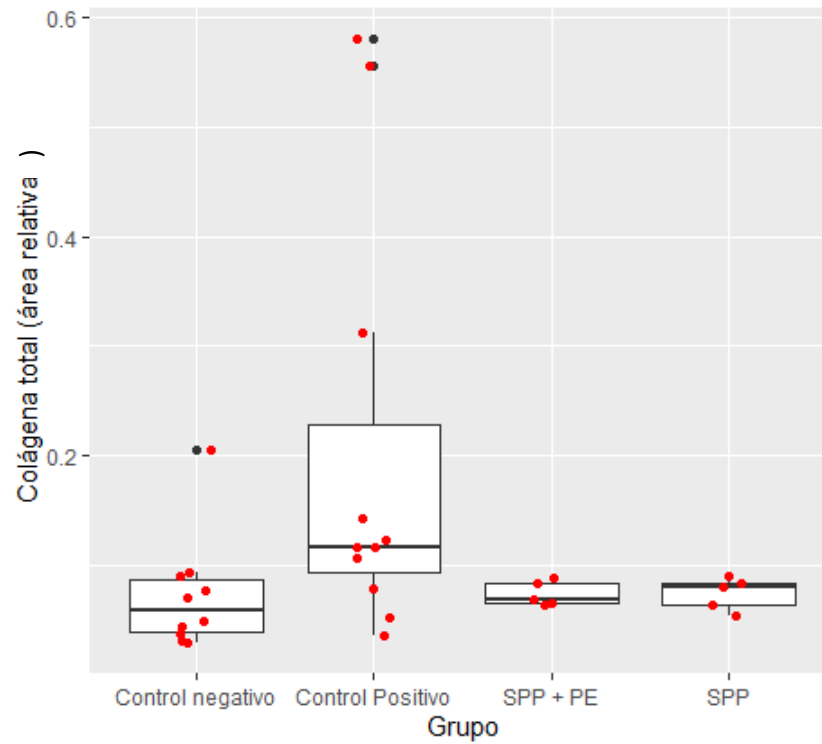


Figura 15. Cuantificación de colágena total en los grupos experimentales. Usando el modelo de medición estandarizado, encontramos diferencias significativas $p < 0.001$ entre los grupos experimentales. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena dentro del tejido pulmonar.

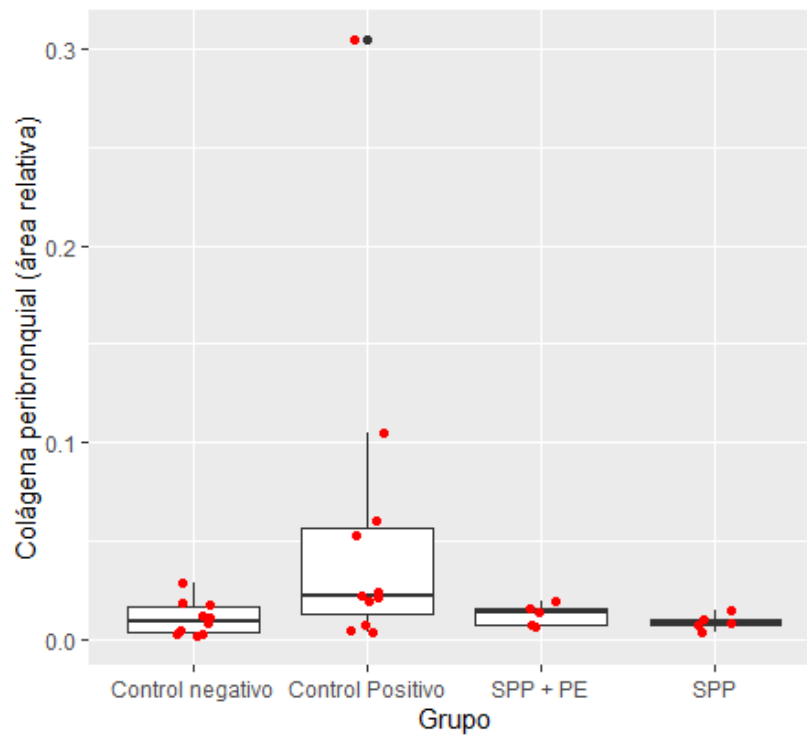


Figura 16. Cuantificación de colágena peribronquial en los grupos experimentales. Usando el modelo de medición estandarizado, encontramos diferencias significativas $p < 0.001$ entre los grupos experimentales. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena alrededor de los bronquios.

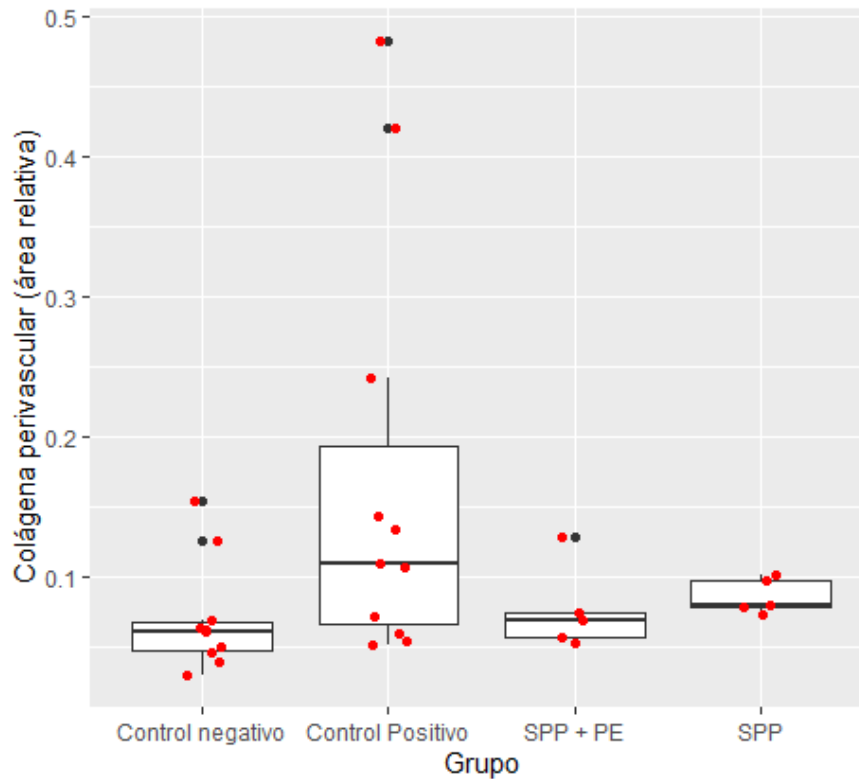


Figura 17. Cuantificación de colágena perivascular en los grupos experimentales. Usando el modelo de medición estandarizado, encontramos diferencias significativas $p < 0.001$ entre los grupos experimentales. Los valores se reportan como el área relativa que ocupa la colágena alrededor de los vasos.

9. DISCUSIÓN

El surfactante pulmonar (SP) es un complejo de lípidos y proteínas cuyas principales funciones son: reducir la tensión superficial en la interfaz aire-líquido y así prevenir el colapso alveolar al final de la espiración; además interactúa con patógenos, eliminándolos y/o previniendo su diseminación (Perez-Gil, 2010).

El empleo de surfactante en modelos animales se ha enfocado principalmente al estudio de su efecto tensoactivo en SDR en modelos de animales prematuros en los cuales ha demostrado mejorar el intercambio de gases, la mecánica pulmonar, la oxigenación, la distensibilidad pulmonar además de disminuir la inflamación (expresión de ARNm de IL-8 y TNF- α) (Gastiasoro-Cuesta, 2006; Wang, 2006).

En este estudio experimental, aislamos un surfactante de origen porcino (SPP) y probamos el efecto que tiene sólo y en combinación con fosfatidiletanolamina (PE) en un modelo murino de FP. Para ello formamos cuatro grupos experimentales: control negativo, control positivo, SPP-PE y SPP, los dos primeros fueron tratados con solución salina y a los dos restantes se les administró SPP-PE y SPP. Los resultados fueron que el SPP y su combinación con PE (SPP-PE), demostraron reducir la fibrosis pulmonar inducida mediante bleomicina; la comparación entre los tratamientos no presenta diferencia estadísticamente significativa.

Numerosos estudios han comparado los tensoactivos disponibles en el mercado; ya que su composición y concentración de fosfolípidos y proteínas, no es consistente; por lo que poseen propiedades farmacológicas diferentes que pueden influir en el tratamiento clínico (Hentschel, 2020).

Tridente y cols. realizaron un metaanálisis de las características farmacológicas y bioquímicas de los tensoactivos de origen animal y compararon los de origen porcino y bovino con respecto a la mortalidad y otros indicadores respiratorios de recién nacidos prematuros con SDR. Los resultados arrojaron que el tensoactivo de origen porcino (poractante- α) redujo la mortalidad y la displasia broncopulmonar (DBP) en los recién nacidos, en comparación con los tensoactivos de origen bovino (Tridente, 2019). Trembath y cols. compararon el efecto de beractante, calfactante y poractante- α , los resultados demostraron una efectividad similar en la prevención del SDR y la displasia broncopulmonar en bebés prematuros (Trembath, 2013).

Fijji y cols. compararon dos tensoactivos uno de origen porcino y el otro bovino, sin hallar diferencias significativas entre ellos, en el tratamiento para SDR en bebés prematuros (Fujii, 2010). Vázquez De Lara y cols. 2000 probaron que beractante induce un fenotipo antifibrótico en fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF) inhibiendo la expresión del colágeno tipo I, aumentando la expresión de la metaloproteinasa de matriz (MMP) -1 y promoviendo la apoptosis de los fibroblastos (Vázquez De Lara, 2000). De acuerdo con los hallazgos anteriores sobre la efectividad de los tensoactivos de origen animal y al efecto antifibrótico presentado por nuestro surfactante (SPP) en la fibrosis pulmonar, pensamos que el SPP aislado en el Laboratorio de Medicina Experimental (LME) de la BUAP, cuenta con las propiedades necesarias en un tensoactivo y adicionalmente posee un efecto antifibrótico.

Estudios previos en el LME demostraron que la administración temprana de SP enriquecido con PE y PE, solos y en conjunto atenúan la fibrosis pulmonar en un modelo murino *in vivo* (Vazquez-de-Lara, 2018); la menor concentración de colágena en los grupos tratados la encontraron con la administración de surfactante enriquecido con PE, lo cual contrasta con nuestro estudio ya que los resultados muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control positivo y los grupos tratados (SPP-PE y SPP); la cual no se muestra al comparar los dos tratamientos administrados, esto puede deberse a que en este estudio no alcanzamos la muestra en los grupos sometidos a tratamiento.

La PE es un fosfolípido presente en la cara citosólica de las membranas celulares de los mamíferos, ayuda a mantener la estabilidad de la membrana al interactuar con otros fosfolípidos, se ha demostrado que la traslocación de la PE en la superficie celular desencadena varios eventos biológicos, entre ellos la apoptosis (Xue, 2014).

Yao y cols. demostraron que la PE inhibe el crecimiento de células HepG2 y SMMC-7721 de carcinoma hepatocelular humano de forma dosis-dependiente; los resultados mostraron que PE no afectó el ciclo celular de dichas células, pero les indujo apoptosis temprana al disminuir el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) antes de la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN; la disfunción mitocondrial es esencial para la vía apoptótica, ya que al reducir el $\Delta\Psi_m$ se libera citocromo C, desencadenando secuencialmente una cascada de caspasas, dentro de ellas la caspasa-3; causando así la apoptosis de las células; además la reducción en el potencial de membrana mitocondrial está estrechamente

relacionada con la regulación negativa de Bcl-2 (un mediador antiapoptótico) y la regulación positiva de Bax, un potente inductor de apoptosis; lo que aumenta la expresión de la caspasa-3; esto sugiere que la vía mitocondrial está potencialmente involucrada en la apoptosis celular inducida por PE (Xue, 2014; Yao, 2009). Los hallazgos anteriores nos alientan a pensar que la PE tiene efecto en los fibroblastos presentes en la FP.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la terapia de SPP y SPP-PE atenúan la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, lo cual da paso al desarrollo de un surfactante enriquecido con PE que pueda ser probado en humanos con patologías pulmonares fibrosantes.

10. CONCLUSIÓN

El surfactante pulmonar extraído de lavados pulmonares en el laboratorio, con y sin adición de fosfatidiletanolamina, administrado por vía inhalada, atenúa la fibrosis pulmonar en el modelo murino de bleomicina.

CAPÍTULO 3

11. LIMITACIONES

Los tensoactivos de origen animal tienen riesgo potencial de efectos secundarios (infecciosos o autoinmunes), por lo cual es importante evaluar las propiedades microbiológicas, físicas y bioquímicas del surfactante pulmonar porcino.

Debido a la interrupción de la fase experimental por la pandemia de Covid-19, no fue posible completar algunas mediciones tales como: la concentración de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar porcino que se realizaría con un kit de medición de fosfatidilcolina; la cuantificación de hidroxiprolina presente en el tejido, la cual hubiera servido para confirmar nuestros hallazgos en el análisis histológico de la cantidad de colágena pulmonar; además de que no fue posible completar la muestra para los grupos con tratamiento de SPP y SPP-PE.

12. FORTALEZAS

La administración inhalada de SPP resulta ser un medio no invasivo, efectivo y de bajo costo para el tratamiento de patologías pulmonares como la SDR y patologías fibrosantes como la FPI; ya que reduce las complicaciones derivadas de la administración del tratamiento, mediante intubación.

El desarrollo de modelos digitales que cuantifiquen tejidos, células o áreas de interés en una investigación o en el área de diagnóstico hace posible la evaluación rápida, segura y múltiple de las muestras; además de que los resultados se pueden corroborar por varios expertos en el área de forma simultánea.

13. PERSPECTIVAS A FUTURO

Las siguientes investigaciones deberán centrarse en estudiar las propiedades físicas, microbiológicas y bioquímicas del SPP sintetizado en el LME; evaluar la estabilidad y permanencia del tensoactivo en los alveolos pulmonares y probar el SPP y su combinación con PE en distintas dosis con la finalidad de obtener una mejor respuesta clínica, mejorando o acelerando el efecto antifibrosante.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, M., Herráez, I., Iturbe, D., & Jiménez-Romero, A. (2018). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Differential Diagnosis. *Medical Sciences*, 6(3), 73.
- Agassandian, M., & Mallampalli, R. K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 612–625.
- Akella, A., & Deshpande, S. B. (2013). *Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders*. 51(January), 5–22.
- American Thoracic Society, & European Respiratory Society. (2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(2), 277–304.
- Baligar, P., Pokhrel, S., & Mukhopadhyay, A. (2016). *Experimental Liver Fibrosis and Intrasplenic Transplantation of CD45 + Bone Marrow Cells*. 6(20).
- Barreto-Rodríguez, J. O., Mejía, M. E., & Buendía-Roldán, I. (2015). Panorama actual de la fibrosis pulmonar idiopática en México. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 74(4), 256–261.
- Benítez, S. C. (2006). Bleomicina: Un modelo de fibrosis pulmonar. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(1), 53–61.
- Betensley, A., Sharif, R., & Karamichos, D. (2016). A Systematic Review of the Role of Dysfunctional Wound Healing in the Pathogenesis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 6(1), 2.
- Bouros, D. (2013). *Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis*. 26(2), 15–17.
- Buendía, I., Matías, C. F., Curbelo, P., Mejía, M., & Noriega, L. (2015). Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la Fibrosis pulmonar idiopática. *Asociación Latinoamericana Del Tórax*, 40.
- Chavarha, M., KhoojInlan, H., Schulwitz, L. E., Biswas, S. C., Rananavare, S. B., & Hall, S. B. (2010). Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophysical Journal*, 98(8), 1549–1557.
- Chen, X., Shi, C., Meng, X., Zhang, K., Li, X., Wang, C., Xiang, Z., Hu, K., & Han, X. (2016). Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating the expression of TGF- β 1 and FGF-2. *Experimental and Molecular Pathology*, 101(1), 22–30.
- Fernandez, I. E., & Eickelberg, O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 380(9842), 680–688.
- Fujii, A. M., Patel, S. M., Allen, R., Doros, G., Guo, C. Y., & Testa, S. (2010). Surfactant alfa and

beractant treatment of very premature infants with respiratory distress syndrome. *Journal of Perinatology*, 30(10), 665–670.

Gastiasoro-Cuesta, E., Alvarez-Diaz, F. J., Rey-Santano, C., Arnaiz-Renedo, A., Loureiro-Gonzalez, B., & Valls-i-Soler, A. (2006). Acute and sustained effects of lucinactant versus poractant- α on pulmonary gas exchange and mechanics in premature lambs with respiratory distress syndrome. *Pediatrics*, 117(2), 295–303.

Glasser, S. W., Hagood, J. S., Wong, S., Taype, C. A., Madala, S. K., & Hardie, W. D. (2016). Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution. *American Journal of Pathology*, 186(5), 1066–1077.

Griese, M. (1999). Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: State of the art. *European Respiratory Journal*, 13(6), 1455–1476.

Guzmán-Silva, A., Vázquez De Lara, L. G., Torres-Jácome, J., Vargaz-Guadarrama, A., Flores-Flores, M., Said, E. P., Lagunas-Martínez, A., Mendoza-Milla, C., Tanzi, F., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2015). Lung beractant increases free cytosolic levels of Ca^{2+} in human lung fibroblasts. *PLoS ONE*, 10(7), 1–25.

Han, S. H., & Mallampalli, R. K. (2015). The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 765–774.

Hashisako, M., & Fukuoka, J. (2015). *Pathology of Idiopathic Interstitial Pneumonias*. 9.

Hentschel, R., Bohlin, K., van Kaam, A., Fuchs, H., & Danhaive, O. (2020). Surfactant replacement therapy: from biological basis to current clinical practice. *Pediatric Research*, 88(2), 176–183.

Hinz, B. (2012). Mechanical Aspects of Lung Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 137–147.

Kekevan, A., Gershwin, M. E., & Chang, C. (2014). Diagnosis and classification of idiopathic pulmonary fibrosis. *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), 355–358.

King Jr, T., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 378, 1949–1961.

Lemyre, B., Fusch, C., Schmölder, G. M., Bouali, N. R., Reddy, D., Barrowman, N., Huneault-Purney, N., & Lacaze-Masmonteil, T. (2017). Poractant alfa versus bovine lipid extract surfactant for infants 24+0 to 31+6 weeks gestational age: A randomized controlled trial. *PLoS ONE*, 12(5), 1–13.

Ley, B., & Collard, H. R. (2013). Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Epidemiology*, 5, 483–492.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6).

Mahavadi, P., Henneke, I., Ruppert, C., Knudsen, L., Venkatesan, S., Liebisch, G., Chambers,

- R. C., Ochs, M., Schmitz, G., Vancheri, C., Seeger, W., Korfei, M., & Guenther, A. (2014). Altered surfactant homeostasis and alveolar epithelial cell stress in amiodarone-induced lung fibrosis. *Toxicological Sciences*, 142(1), 285–297.
- Mejía, M., Buendía-Roldán, I., Mateos-Toledo, H., Estrada, A., Espinoza-Hernández, M., Juárez-Hernández, F., Vargas-Domínguez, C., Selman, M., Acuña-Kaldman, M., Aguilar-Navarrete, Y., Arreola-Morales, A., Bizarrón-Muro, A., Bringas-Locela, E., Ceballos-Zúñiga, O., Chan-Mérida, F. J., Chavarría-Martínez, U., Chávez-Sarabia, J., Domínguez-Peregrina, A., Espitia-Hernández, G., ... Vázquez-García, A. (2016). Primer consenso Mexicano sobre fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax*, 75(1), 32–51.
- Molina-Molina, M., Pereda, J., & Xaubet, A. (2007). Modelos experimentales para el estudio de la fibrosis pulmonar: Utilidad práctica actual y futura. *Archivos de Bronconeumología*, 43(9), 501–507.
- Moosavi, A., & Ardekani, A. M. (2016). Role of epigenetics in biology and human diseases. *Iranian Biomedical Journal*, 20(5), 246–258.
- Moreno Galdó A, Mir Messa I, L. C. S. (2017). Neumopatía intersticial. Sospecha clínica y abordaje. *Protoc Diagn Ter Pediatr*, 1, 221–236.
- Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Glassberg, M. K., Kardatzke, D., Jr, T. E. K., & Lancaster, L. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *The Lancet*, 377(9779), 1760–1769.
- Olmeda, B., Martínez-Calle, M., & Pérez-Gil, J. (2017). Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Annals of Anatomy*, 209, 78–92.
- Pell, R., Oien, K., Robinson, M., Pitman, H., Rajpoot, N., Rittscher, J., Snead, D., Verrill, C., Driskell, O. J., Hall, A., James, J., Jones, L. J., Craig, C., Sloan, P., Thomas, G. J., Elliott, P., Cheang, M., Rodriguez-Justo, M., Rees, G., ... Morden, J. (2019). The use of digital pathology and image analysis in clinical trials. *Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(2), 81–90.
- Peng, R., Sridhar, S., Tyagi, G., Phillips, J. E., Garrido, R., Harris, P., Burns, L., Renteria, L., Woods, J., Chen, L., Allard, J., Ravindran, P., Bitter, H., Liang, Z., Hogaboam, C. M., Kitson, C., Budd, D. C., Fine, J. S., Bauer, C. M. T., & Stevenson, C. S. (2013). Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for “Active” Disease. *PLoS ONE*, 8(4).
- Perez-Gil, J. (2010). El Sistema del Surfactante Pulmonar. *Investigación y Ciencia*, 38–45.
- Raja, M. (2011). Do small headgroups of phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid lead to a similar folding pattern of the K⁺ channel? *Journal of Membrane Biology*, 242(3), 137–143.
- Richeldi, L., M. du Bois, R., Raghu, G., Azuma, A., & Brown, K. (2014). Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*, 370(22), 2071–2082.

- Sakai, N., & Tager, A. M. (2013). Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 911–921.
- Savani, R. C., Godinez, R. I., Godinez, M. H., Wentz, E., Zaman, A., Cui, Z., Pooler, P. M., Guttentag, S. H., Beers, M. F., Gonzales, L. W., & Ballard, P. L. (2001). Respiratory distress after intratracheal bleomycin: selective deficiency of surfactant proteins B and C. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(3), L685–L696.
- Schwartz, D. A. (2016). Idiopathic Pulmonary Fibrosis Is a Complex Genetic Disorder. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 127, 34–45.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., & Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and management. *Respiratory Research*, 19(1), 1–18.
- Sun, Y., Yang, R., Zhong, J. G., Fang, F., Jiang, J. J., Liu, M. Y., & Lu, J. (2009). Aerosolised surfactant generated by a novel noninvasive apparatus reduced acute lung injury in rats. *Critical Care*, 13(2), 1–9.
- Tanjore, H., Blackwell, T. S., & Lawson, W. E. (2012). Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(8), L721–L729.
- Taskar, V. S. (2006). Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3, 293–298.
- Todd, Nevins W; Luzina, Irina G; Atamas, S. P. (2012). Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5, 3–24.
- Travis, W. D., Costabel, U., Hansell, D. M., King, T. E., Lynch, D. A., Nicholson, A. G., Ryerson, C. J., Ryu, J. H., Selman, M., Wells, A. U., Behr, J., Bouros, D., Brown, K. K., Colby, T. V., Collard, H. R., Cordeiro, C. R., Cottin, V., Crestani, B., Drent, M., ... Valeyre, D. (2013). An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 733–748.
- Trembath, A., & Hornik, C. (2013). NIH Public Access. *J Pediatr*, 163(4), 955–960.
- Tridente, A., De Martino, L., & De Luca, D. (2019). Porcine vs bovine surfactant therapy for preterm neonates with RDS: systematic review with biological plausibility and pragmatic meta-analysis of respiratory outcomes. *Respiratory Research*, 20(1), 28.
- Tuck, S. (2011). Extracellular vesicles: Budding regulated by a phosphatidylethanolamine translocase. *Current Biology*, 21(24), R988–R990.
- Vance, J. E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: Two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research*, 49(7), 1377–1387.

- Vazquez-de-Lara, L., Tlatelpa-Romero, B., Romero, Y., Fernández-Tamayo, N., Vazquez-de-Lara, F., M. Justo-Janeiro, J., Garcia-Carrasco, M., de-la-Rosa Paredes, R., Cisneros-Lira, J., Mendoza-Milla, C., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2018). Phosphatidylethanolamine Induces an Antifibrotic Phenotype in Normal Human Lung Fibroblasts and Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2758.
- Vázquez De Lara, L., Becerril, C., Montaña, M., Ramos, C., Maldonado, V., Meléndez, J., Phelps, D. S., Pardo, A., & Selman, M. (2000). Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *279*(5 23-5), 950–957.
- Wang, X., Sun, Z., Qian, L., Guo, C., Yu, W., Wang, W., Lu, K. W., Tausch, H. W., & Sun, B. (2006). Effects of hyaluronan-fortified surfactant in ventilated premature piglets with respiratory distress. *Biology of the Neonate*, *89*(1), 15–24.
- Wielenga, V. T., & Vainer, B. (2012). Digital methods in pathology - the future is already here. *Apmis*, *120*(4), 255.
- Williams, B. J., Bottoms, D., & Treanor, D. (2017). Future-proofing pathology: The case for clinical adoption of digital pathology. *Journal of Clinical Pathology*, *70*(12), 1010–1018.
- Xaubet, A., Ancochea, J., Bollo, E., Fernández-fabrellas, E., Franquet, T., Molina-molina, M., & Angeles, M. (2013). *Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática*. *49*(8), 343–353.
- Xu, J., Gonzalez, E. T., Iyer, S. S., Mac, V., Mora, A. L., Sutliff, R. L., Reed, A., Brigham, K. L., Kelly, P., & Rojas, M. (2009). Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *64*(7), 731–739.
- Xue, L., Li, M., Chen, T., Sun, H., Zhu, J., Li, X., Wu, F., Wang, B., Li, J., & Chen, Y. (2014). PE-induced apoptosis in SMMC-7721 cells: Involvement of Erk and Stat signalling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, *34*(1), 119–129.
- Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2015). Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research*, *165*(1), 48–60.
- Yao, Y., Huang, C., Li, Z. F., Wang, A. Y., Liu, L. Y., Zhao, X. G., Luo, Y., Ni, L., Zhang, W. G., & Song, T. S. (2009). Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/bax pathway. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(14), 1751–1758.

15. ANEXOS

Tabla de variables

Tabla 5. Variables de medición

Variable	Escala de medición	Instrumento de medición	Valor
Colágena	Cuantitativa continua	Hidroxioprolina	µg/µl
	Cualitativa continua	<i>Orbit Image Analysis</i>	% área teñida

Infraestructura física y humana

Recursos humanos

Director de Tesis

- D.C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Codirector de Tesis

- D.C. Mario García Carrasco

Anatomopatóloga clínica

- Dra. Nora Fernández Tamayo

Asesora de prácticas de laboratorio

- M. C. Beatriz Tlatelpa Romero

Médico veterinario y zootécnico del Bioterio Central “Claude Bernard” BUAP.

- Francisco Ramos Collazo, No. de Céd. Prof. 6519572

Alumna de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

- María Isabel Martínez Hernández

Recursos físicos y financieros

Todos los experimentos se realizarán y financiarán por el laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Aspectos éticos

El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizará en apego a la NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El objetivo de esta norma es establecer y unificar las especificaciones técnicas para el cuidado, producción y uso de los animales de laboratorio que debe cumplir el personal relacionado en el campo de investigación con este tipo de animales. Debe aplicarse a todos los Bioterios o establecimientos en el territorio mexicano que manejen roedores: ratón, ratas, cobayos y hámster. El Bioterio "Claude Bernard" de la BUAP cumple con los lineamientos establecidos en la norma referentes al personal, los cuidados y las instalaciones adecuadas para mantener al modelo biológico. Los responsables internos al cumplimiento de la norma son el médico veterinario, un investigador de alta jerarquía de la institución propia que tenga experiencia en el cuidado y manejo de animales de laboratorio y el alumno de maestría. Los animales se identificarán por medio de una ficha técnica en la cual se describa el estado genético y si contiene o no alguna enfermedad, la edad, peso y género. Serán protegidos contra condiciones climáticas extremas, se les brindará agua y alimento cuando este indicado y se protegerán contra traumatismos.

Técnicas de laboratorio

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Los pulmones se fijarán y se incluirán en parafina como se describe en Baligar y cols. (Baligar, 2016) Las secciones se cortarán de 4-5 μm de tejido pulmonar recolectado de los ratones, después se incluirán en parafina y se montarán en un portaobjetos de vidrio. Se colocarán los portaobjetos en los estantes de vidrio para teñir. Los cortes se desparafinarán con dos baños sucesivos de xileno por 10 min cada uno. Después se hidratarán las secciones de pulmón, pasando por concentraciones decrecientes de alcohol: cambios de alcohol absoluto 5 min cada uno, 95% de alcohol durante 2 min y 70% de alcohol durante 2 min. Después se lavarán los cortes con agua destilada. Consecutivamente se pasarán los cortes para ser embebidos en la solución de hematoxilina de Mayer durante 8 min. Pasado este tiempo se lavarán las laminillas con agua corriente durante 10 min y después con agua destilada. Inmediatamente se sumergirán en una solución de eosina al 1% durante 30 segundos durante 1 min. Posteriormente serán deshidratados en alcohol al 95% y alcohol absoluto, con 2 cambios de 2 min cada uno o hasta que se elimine el exceso de eosina que se comprobará

bajo el microscopio. Por último, se harán dos cambios de xileno durante 5 min. Finalmente se cubrirán con resina para la observación y preservación del tejido.

Tinción con Tricrómico de Masson

Para la realización de esta técnica se desparafinarán y rehidratarán las secciones de pulmón como se indicó anteriormente. Se lavarán las secciones de pulmón en agua destilada. Se empleará líquido de Bouin precalentado para fijar el color al tejido, durante 1 hr a 56-60 °C o toda la noche a temperatura ambiente. Se teñirá el tejido con solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 min. Posteriormente se lavará con agua tibia corriente durante 10 min. Se enjuagará con agua destilada; para proceder a la tinción con solución de fucsina de ácido escarlata de Biebrich durante 10-15 min. Se repetirá el enjuague en agua destilada. Se diferenciará en solución de ácido fosfomolibdico durante 10-15 min. Se observarán las laminillas frecuentemente a simple vista. Una vez que las áreas ricas en colágeno pierdan el color rojo se girará para despejarse y se continuará con el siguiente paso. Se deberá transferir a los portaobjetos directamente la solución azul de anilina y se teñirá durante 5-10 min. Se enjuagará con agua destilada y diferenciará en solución de ácido acético al 1% durante 2-5 min. Se procederá a lavar con agua destilada. Se deberá deshidratar muy rápidamente con alcohol al 95% y luego con alcohol absoluto para limpiar la tinción con fucsina de ácido escarlata de Biebrich. Se realizará el montaje con medio resinoso. Es recomendable que se observe una laminilla teñida con tricrómico montándola en un microscopio óptico.