

## Construcción de un modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina

### Making an animal model of Bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Dacia Malambo García<sup>1</sup>, Luis Veloza Cabrera<sup>2</sup>, Marta Tuñón Pitalúa<sup>3</sup>, Javier Baena Del Valle<sup>4</sup>, Gustavo Mora-García<sup>5</sup>, Gabriel Ibarra Jiménez<sup>6</sup>, Claudio Gómez-Alegría<sup>7</sup>, Doris Gómez-Camargo<sup>8</sup>

#### Resumen

La fibrosis pulmonar es una enfermedad crónica, progresiva y letal, cuya etiología se desconoce. El modelo de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina en ratas es útil para ilustrar la patobiología in vivo de la enfermedad, así como para identificar nuevos blancos farmacológicos y estimar la eficiencia de nuevas moléculas o procedimientos

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue construir un modelo animal de fibrosis pulmonar secundaria a Bleomicina, en ratas Wistar, como herramienta que pueda servir de base para futuros diseños experimentales.

**Materiales y métodos:** Se trabajó con dos grupos de ratas Wistar para la administración del medicamento por vía intratraqueal. El grupo experimental recibió una dosis única (2.0 U/Kg) de Bleomicina, mientras que el grupo control recibió un volumen equivalente de solución salina. A los 14 o 28 días se realizó un lavado broncoalveolar con recuento total y diferencial celular y análisis histopatológico pulmonar.

**Resultados:** La histología de una parte del grupo experimental tratado con Bleomicina y sacrificado a los 14 días reveló daño pulmonar caracterizado por inflamación aguda, hemorragia intraalveolar y proliferación fibroblástica intersticial incipiente; en el resto del grupo experimental la histología a 28 días reveló además alteración de la arquitectura pulmonar debida a fibrosis y aumento en el número de macrófagos intraalveolares e inflamación linfocitaria.

<sup>1</sup> Bióloga, M. Sc. en Genética. Docente de la Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). daciaisabel@gmail.com

<sup>2</sup> MD, Residente III de Patología anatómica y clínica, Universidad Nacional de Colombia. luis\_lui\_lu@hotmail.com

<sup>3</sup> MD, patóloga. Docente de la Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). mtunon@gmail.com

<sup>4</sup> MD, Patólogo, Fundación Santa Fe de Bogotá. bedazzled08@gmail.com

<sup>5</sup> MD, docente de la Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). gustavo.mora.garcia@gmail.com

<sup>6</sup> MD, neumólogo, Centro de Rehabilitación Pulmonar, Cartagena (Colombia). gaima@enred.com

<sup>7</sup> Bioquímico, doctor en Ciencias. Docente Universidad Nacional de Colombia. cjmomez@unal.edu.co

<sup>8</sup> Bacterióloga, M. Sc. en Microbiología, doctor en Biología Molecular. Docente de la Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena (Colombia). degomez@hotmail.com

**Correspondencia:** Doris Esther Gómez-Camargo. Universidad de Cartagena, Centro Calle de la Universidad, carrera 6 n° 36-100. Oficina Doctorado en Medicina Tropical. Teléfono: 3003109412. degomez@hotmail.com

Fecha de recepción: 15 de julio de 2015  
Fecha de aceptación: 8 de octubre de 2015

**Conclusiones:** Se implementó satisfactoriamente un modelo de fibrosis pulmonar inducido farmacológicamente por Bleomicina en ratas Wistar.

**Palabras clave:** fibrosis pulmonar, bleomicina, lavado broncoalveolar, modelos animales de enfermedad.

### Abstract

Pulmonary fibrosis is a chronic, progressive and fatal disease, whose etiology is unknown. The model of Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats is useful to illustrate the pathobiology of the disease in vivo as well as to identify new drug targets and to estimate the efficacy of new promising molecules or procedures.

**Objective:** The aim of this work was to make an animal model of pulmonary fibrosis secondary to bleomycin, in Wistar rats, as a tool that can serve as a basis for future experimental designs.

**Materials and methods:** We worked with two groups of Wistar rats which were anesthetized and intubated for intratracheally drug administration. The experimental group received a single dose (2.0 U / kg) of Bleomycin, while the control group received an equivalent volume of saline. At 14 or 28 days after treatment, a bronchoalveolar lavage with total and differential cellular count were performed. Additionally, the lungs were dissected for histopathological analysis.

**Results:** In the experimental group treated with Bleomycin and sacrificed at 14 days, histology revealed lung damage characterized by acute inflammation, intra-alveolar hemorrhage and fibroblast proliferation; in sacrificed animals at 28 days, alteration of lung architecture due to fibrosis evidenced by trichrome stain, increase in the alveolar macrophages number and lymphocytic chronic inflammation were observed.

**Conclusions:** In this study, a model of pharmacologically induced pulmonary fibrosis by Bleomycin has been successfully implemented.

**Keywords:** pulmonary fibrosis, bleomycin, bronchoalveolar lavage, experimental animal models.

## INTRODUCCIÓN

La fibrosis pulmonar es una enfermedad progresiva y fatal debida a un proceso inflamatorio crónico descontrolado en los pulmones.

Una de las principales dificultades para encontrar un tratamiento apropiado para esta enfermedad es la falta de conocimiento sobre los mecanismos patogénicos que conducen a la fibrosis (1, 2).

La fisiopatología de la fibrosis pulmonar involucra células inflamatorias activadas que se acumulan en las vías aéreas bajas; las cuales producen especies reactivas de oxígeno, lo cual lleva a daño tisular y prolife-

ración de fibroblastos que al activarse liberan proteínas a la matriz extracelular en exceso, lo cual distorsiona la arquitectura del tejido pulmonar con destrucción o pérdida de la función del órgano.

Las opciones de tratamiento están limitadas a pesar de la variedad de drogas antifibróticas disponibles, y la sobrevivencia del paciente es de tres a cinco años después del diagnóstico (3 - 5).

La clasificación de los desórdenes fibróticos pulmonares es amplia, y entre ellas, la fibrosis pulmonar secundaria a fármacos se presenta con características clínicas pulmonares similares a la fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

De las enfermedades intersticiales del pulmón, la IPF es la más conocida por su agresividad y pronóstico ominoso (6 - 8).

Los modelos animales de fibrosis pulmonar son críticos para investigar los mecanismos patológicos de la enfermedad e importantes para la evaluación preclínica de nuevas terapias (9).

Un fármaco utilizado para tratar algunos tipos de cáncer es la Bleomicina, un glicopéptido originalmente obtenido de *Streptomyces verticillus* con varios atributos que lo hacen elegible, entre los cuales destaca el hecho de que no induce inmunosupresión ni mielosupresión. A nivel celular, la Bleomicina inhibe la síntesis de ADN mediante la producción de radicales libres que alteran la molécula. Como efecto secundario produce fibrosis pulmonar dependiente de la dosis.

Se considera que la neumonitis inicial, producida por Bleomicina, afecta al 46% de los pacientes en tratamiento, y de ellos, un 3 % muere por los efectos indeseables del medicamento (10 - 12).

Ese efecto indeseable del fármaco se ha aprovechado para estudiar los daños pulmonares en animales de experimentación, al inducir fibrosis pulmonar secundaria a Bleomicina. Este fármaco induce fibrosis pulmonar intersticial focal e inflamación, caracterizada por disminución significativa de la capacidad pulmonar (13).

Las ratas tratadas con Bleomicina intratraquealmente presentan elevación de la frecuencia respiratoria (10,13), alveolitis con edema y fibrosis incipiente a los 14 días de tratamiento; a los 28 días se observa fibrosis intersticial generalizada.

El objetivo de este trabajo fue construir un modelo animal de fibrosis pulmonar secundario a Bleomicina, en ratas Wistar, como herramienta que pueda servir de base para futuros diseños experimentales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo constituye un estudio de tipo descriptivo observacional con técnicas de laboratorio, realizado en el Laboratorio de Investigaciones de la Universidad de Cartagena (Cartagena, D.T. y C., Colombia) y en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Bogotá, D. C., Colombia).

### Material biológico

Se utilizaron 10 ratas Wistar de 250 a 350 gramos de peso, las cuales fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud (Bogotá, D. C.). Fueron hospedadas en cajas, en grupos de tres, en condiciones libres de patógenos y con acceso a voluntad al alimento concentrado y agua.

Se cumplieron todas las normas de Colombia sobre el uso de animales de experimentación, consignadas en la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de los Animales) (14) y en la Resolución 8430 de 1993, en la que se establecen normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (título V: Animales) (15).

El Acuerdo 79 de 2003, Código de Policía, se tuvo en cuenta en lo que se refiere al capítulo IV: Protección y cuidado de los animales; igualmente, los procedimientos estuvieron ajustados al Memorando 0013 de marzo de 2014 de la Procuraduría sobre el cumplimiento de la Ley.

Se obtuvo aval del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena por cumplimiento con los lineamientos éticos amparados en las mencionadas regulaciones como Ley, Resolución y Acuerdo.

De igual manera, se trabajó con el mínimo número de animales necesarios para la realización del modelo, con seguimiento diario y sacrificio sin sufrimiento.

### **Estandarización del procedimiento de anestesia**

Inicialmente se utilizó Ketamina, administrada por vía intramuscular (músculo del muslo posterior), la cual actúa sobre el sistema reticular activador del tallo cerebral, y Xylazina, que produce relajación muscular por su acción sobre los receptores adrenérgicos alfa. Se observó pérdida del reflejo de enderezamiento, no el de deglución.

Se ensayó la anestesia por vía intraperitoneal (IP) en la mitad inferior del abdomen a las siguientes dosis: Ketamina (80 mg/kg) y Xylazine (8 mg/kg), y se observó pérdida del reflejo de enderezamiento y de deglución. Se decidió además administrar Atropina: 0,05mg/kg, la cual disminuye la secreción salival y la sensibilidad y motilidad de la laringe, lo cual facilita la intubación. La vía IP finalmente se aplicó a las ocho ratas experimentales y dos controles.

### **Intubación y administración de Bleomicina**

Después de perder los reflejos de enderezamiento y deglución, la rata anestesiada fue colocada en posición supina sobre una tabla inclinada, se aseguraron los incisivos superiores al sostén dental y se colocó un tubo debajo de la nuca para alinear los ejes (bucal, faríngeo y laríngeo).

La intubación se realizó con un catéter intravenoso con una cánula n°16 (o de menor calibre), dirigido con una guía metálica, la cual se retiraba al pasar la glotis (16). Luego se procedió a instilar 2,0 unidades/kg de peso de Sulfato de Bleomicina (Blenoxane®, Bristol-Myers Squibb Company, New York) vial con 15 unidades) en un volumen máximo de 0,25 ml.

Después de la instilación se insuflaron pequeños volúmenes de aire lentamente, para asegurar la correcta distribución de la solución de Bleomicina en los pulmones del animal.

Se realizó seguimiento de los signos vitales durante la recuperación.

El grupo experimental (ocho ratas) recibió tratamiento con Bleomicina; el grupo control (dos ratas) recibió igual volumen de solución salina.



Fuente: autores.

**Figura 1.** Rata en posición supina sobre una tabla inclinada, con incisivos superiores asegurados al sostén dental. La intubación se realizó con un catéter intravenoso dirigido con una guía metálica.

La figura 1 ilustra un animal anestesiado e intubado momentos antes de la administración de la Bleomicina.

### Lavado broncoalveolar

De las ocho ratas utilizadas como grupo experimental cuatro fueron sacrificadas a los 14 días postratamiento junto a una rata control usando Penthal® (INVET, Bogotá, D. C.) intraperitoneal, a una dosis letal de 150 mg/kg en un volumen de 0.5 ml. Las ratas restantes fueron sacrificadas a los 28 días de tratamiento, siguiendo el mismo protocolo.

Inmediatamente posterior al sacrificio se realizó un lavado broncoalveolar con una jeringa de 5 ml, instilando lentamente 4 ml de solución salina (cuatro veces). Los volúmenes de líquido se recogieron en un tubo Falcon (Becton, Dickinson and Company, BD. San José, California, EE.UU.) siguiendo el procedimiento descrito por Dussaubat, Cryan y cols. (17,18). De los 16 ml administrados, se recuperaron aproximadamente 12 ml. Se obtuvo 1.5 ml para recuento celular, que se realizó en una cámara de Neubauer (Clay-Adams Co, New York). Los resultados se informaron como número de células por mm<sup>3</sup>. El contenido restante se dividió en partes iguales en dos tubos estériles, que se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos. Un tubo se utilizó para el recuento diferencial; el botón celular se utilizó para realizar extendidos, los cuales fueron coloreados con el reactivo de Wright (Harleco, EE.UU.) y analizados bajo microscopio óptico. El resultado se informó en porcentaje de los distintos tipos celulares. El segundo tubo se conservó para extracción de ARN total en otro proyecto.

### Obtención y procesamiento de pulmones de rata

Una vez realizado el lavado broncoalveolar se instiló formol al 10 % en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 y se procedió a la disección

de la cavidad torácica para la obtención de los pulmones.

Ambos pulmones de cada animal fueron disecados; cortes del pulmón izquierdo fueron fijados en formol fosfato salino al 10% y embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Masson para el análisis histopatológico mediante microscopía óptica y determinación del puntaje de Ashcroft para fibrosis pulmonar por patólogos con experiencia en patología pulmonar (19). Además, el grado de inflamación se estimó por puntajes de intensidad de 0 a 3, según las indicaciones de López y cols. (20). El pulmón derecho se conservó congelado a -80 °C para estudios posteriores (no mostrados en este trabajo). Los procedimientos generales se esquematizan en el cuadro 1.

## RESULTADOS

### Anestesia e intubación

Se probaron dos vías de administración del anestésico: intramuscular e intraperitoneal. La vía intraperitoneal condujo a pérdida de los reflejos de enderezamiento a los tres minutos y de deglución a los seis, por lo cual fue la de elección en este estudio.

Los mejores resultados se lograron con la administración de atropina, a una dosis de 0,05 mg/kg, lo cual produjo una disminución de la secreción salival, sensibilidad y motilidad de la laringe, facilitando la intubación.

Para el procedimiento de intubación fue conveniente utilizar un otoscopio o una linterna para transiluminar la laringe, lo cual permitió mayor visualización de la zona. Para evitar provocar traumas en la lengua al traccionarla se utilizaron pinzas planas sin garra para visualización de la glotis.



## Recuento de células del lavado broncoalveolar

Una de las ratas tratadas con Bleomicina murió a los 19 días después del tratamiento, con signos de dificultad respiratoria.

Para el recuento de células total y diferencial se utilizaron los fluidos provenientes de seis ratas. Los resultados del recuento celular se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Recuento total y diferencial de células del fluido del lavado broncoalveolar (FLB). Se analizaron 6 FLB correspondientes a dos ratas con Bleomicina sacrificadas a los 14 días y su control; y dos ratas con Bleomicina sacrificadas a los 28 días y su control

Tratamiento	Rata-FLB	Recuento Total (mm <sup>3</sup> )	Recuento Diferencial %		
			Neutrófilos	Macrófagos	Linfocitos
Control 14 días	5	300	4	91	5
Bleomicina 14 días	4	800	66	29	5
Bleomicina 14 días	6	400	18	66	16
Control 28 días	1	299	9	91	0
Bleomicina 28 días	2	600	37	62	1
Bleomicina 28 días	3	400	37	63	0

En los líquidos de lavados bronquioalveolares de las ratas tratadas con Bleomicina se observó un aumento en el número de leucocitos en el recuento total.

En el recuento diferencial se observó un predominio general de macrófagos, excepto en la muestra 4, en la que predominaron los neutrófilos sobre los macrófagos.

En la muestra 6 hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos células que intervienen en la respuesta humoral.

## Análisis patológico de los pulmones

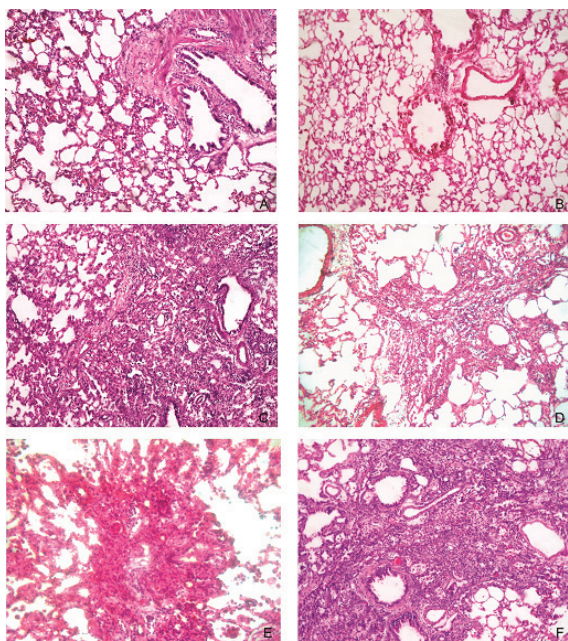
Macroscópicamente, los pulmones de las ratas tratadas con Bleomicina se observaron de un color pardo oscuro, mientras que los de las ratas control fueron de una tonalidad rojiza anaranjada brillante.

Ninguno de los controles, que recibieron solución salina, presentó a nivel microscópico cambios histopatológicos inflamatorios o fibróticos en los cortes pulmonares teñidos con hematoxilina y eosina y tinción histoquímica de Tricrómico de Masson.

La figura 2 compara los hallazgos histológicos encontrados en sujetos experimentales y control a los 14 días posterior al tratamiento. En el grupo de ratas tratadas con Bleomicina, la histología reveló daño pulmonar con edema alveolar, caracterizado por infiltrado leucocitario, hemorragia intralveolar y proliferación fibroblástica.

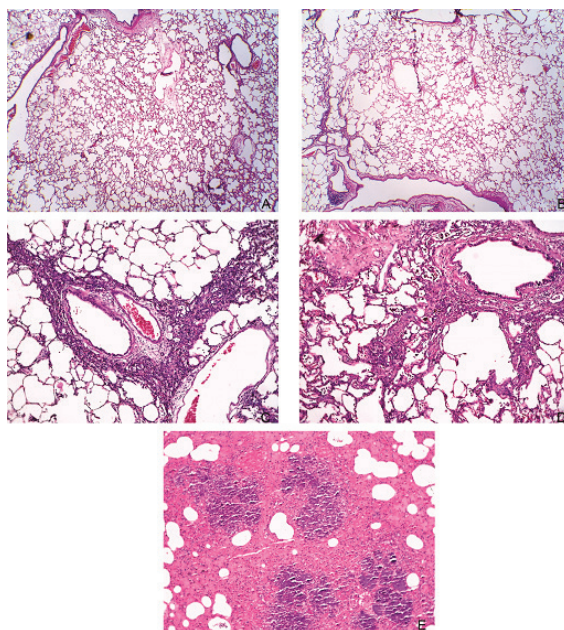
La figura 3 muestra los hallazgos histológicos en ratas tratadas con Bleomicina y sacrificadas a los 28 días. Se observó alteración de la arquitectura pulmonar con fibrosis extensa, hiperplasia del revestimiento alveolar con exceso de matriz extracelular, evidenciada por acumulación de colágeno con la coloración histoquímica de Tricrómico de Masson (figura 4).

Los resultados revelan que el tratamiento a los 14 días con Bleomicina indujo fibrosis pulmonar incipiente acompañada de inflamación intersticial intensa, mientras que la extensión del tratamiento a los 28 días resultó en proliferación de fibroblastos y síntesis excesiva de colágeno; estos cambios fueron representados con elevados índices en el puntaje de Ashcroft (tabla 2) para fibrosis pulmonar en ambos grupos experimentales. Asimismo, se observaron focos de necrosis tisular a los 14 días; similar hallazgo se observó a los 28 días; posiblemente resultado de un proceso de daño tisular que dio inicio durante la primera semana de tratamiento.



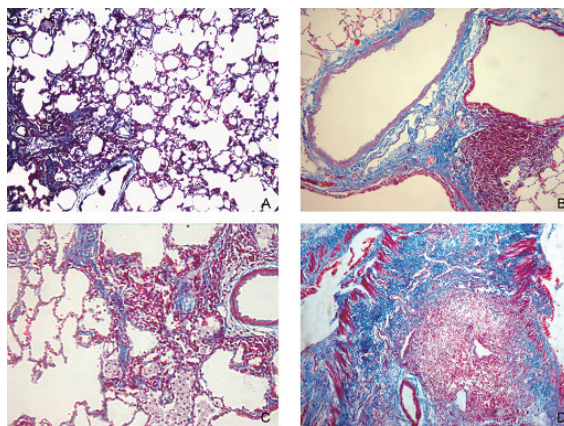
Fuente: autores.

**Figura 2.** Comparación de cortes histológicos de pulmones de ratas con tratamiento versus controles a los 14 días post-tratamiento (40X). A y B: controles, ratas 5 y 8. C: rata 6. D: rata 7. E: rata 9. F: rata 10, todas tratadas con Bleomicina. Los cortes muestran tractos fibrosos, inflamación intersticial con enfisema compensatorio y acúmulos de macrófagos alveolares



Fuente: autores.

**Figura 3.** Comparación de cortes histológicos de pulmones de ratas con tratamiento versus controles a los 28 días post-tratamiento (40X). A y B: controles, ratas 1. C: rata 2. D: rata 3, todas tratadas con Bleomicina. Los cortes muestran tractos fibrosos, fibrosis adventicial, neumonitis, con nódulos fibroblásticos y numerosos macrófagos alveolares. E: rata 4, con neumonía bacteriana



Fuente: autores.

**Figura 4.** Hallazgos histológicos de fibrosis pulmonar en ratas tratadas con bleomicina a 14 (A y B) y 28 días (C y D). A: rata 7. B: rata 9. C: rata 3. D: rata 2. Nótese la marcada fibrosis (color azul) acentuada alrededor de bronquios y vasos sanguíneos, con inflamación intersticial acompañante. Tinción tricrómica de Masson, 40X

**Tabla 2.** Determinación del grado de fibrosis pulmonar en inflamación en las ratas controles y con tratamiento a los 14 y 28 días. Para la estimación de la fibrosis pulmonar el puntaje de Ashcroft utiliza como grado 0 el pulmón con histología normal y grado 8 la obliteración fibrosa total. Al componente inflamatorio se le dio un grado de 0 a 4, siendo 0 la ausencia de infiltrado inflamatorio y 4 neumonía.

Tratamiento	Rata	Puntaje Ashcroft	Inflamación
Control 14 días	5 y 8	0	0
Bleomicina 14 días	6	0,05	1
Bleomicina 14 días	7	2,05	3
Bleomicina 14 días	9	0,41	2
Bleomicina 14 días	10	3,78	3
Control 28 días	1	0	0
Bleomicina 28 días	2	1,97	3
Bleomicina 28 días	3	0,32	1
Bleomicina 28 días	4	Neumonía	4

## DISCUSIÓN

Este trabajo describe la construcción de un modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina, con base en el método sencillo de intubación endotraqueal de ratas descrito por Lizio y cols. (16).

Además de la Bleomicina, otros fármacos, sustancias y medios físicos han sido empleados para inducir fibrosis pulmonar; entre ellos se destacan: asbesto, irradiación, sílica, transferencia génica del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los cuales, en general, muestran una respuesta fibrótica posterior a una reacción inflamatoria.

Igual que en la enfermedad humana, el cuadro histológico se caracteriza por inflamación

del parénquima por segmentos, lesión e hiperplasia de la células epiteliales y fibrosis intersticial (20, 21).

Como se describió en los resultados, hubo un hallazgo consistente de necrosis tisular a los 14 y 28 días.

En la literatura se reporta que durante las primeras 24 horas la fibrosis pulmonar por Bleomicina en roedores inicia como necrosis de la célula epitelial; dos a tres días después de la administración de Bleomicina aparece alveolitis aguda; la inflamación intersticial intensa aparece cuatro a doce días después del tratamiento con Bleomicina. Aunque el periodo incipiente de daño tisular no fue observado en este modelo, es plausible que los hallazgos reportados correspondan al efecto temprano de la acción de la Bleomicina.

La proliferación de fibroblastos y síntesis de matriz extracelular excesiva se inicia de 4 a 14 días post Bleomicina y aproximadamente tres semanas después el contenido de colágeno ha aumentado al doble (20, 22, 23); similar a como fue descrito en este modelo.

La Bleomicina es uno de los fármacos más ampliamente utilizados para el tratamiento de algunas neoplasias, pero tiene como limitación que a las dosis usuales empleadas produce toxicidad pulmonar en el 2 % de los casos (12, 24). Este hecho ha permitido que sea utilizado para la inducción química (farmacológica) de fibrosis pulmonar en modelos animales.

El daño al pulmón por tratamiento con Bleomicina es rápido al principio, con una fase de alveolitis inicial caracterizada por edema, acumulación de células inflamatorias, incluyendo macrófagos, linfocitos y



neutrófilos, que conducen a la proliferación de fibroblastos.

La siguiente fase se caracteriza por acumulación de fibroblastos y depósito aumentado de colágeno en el intersticio, y de otros componentes de la matriz extracelular que distorsionan la arquitectura pulmonar (25, 26).

Similares resultados se observaron en este estudio; en el que además se encontró aumento significativo del recuento de células en el lavado broncoalveolar, tanto en las ratas tratadas con Bleomicina sacrificadas a los 14 días como en las que fueron sacrificadas a los 28 días.

Similar a los resultados de Dussaubat y cols. (17), nuestros resultados revelan que en los animales sacrificados a los 14 días después del tratamiento con Bleomicina se encontraron bronquiolos con inflamación en la pared e infiltrado inflamatorio permeando el epitelio. Se observó también proliferación de fibroblastos en el intersticio y focos de inflamación con proliferación fibroblástica, además de macrófagos alveolares en la luz. En los animales sacrificados a los 28 días después del tratamiento con Bleomicina, por su parte, se observó proliferación fibroblástica con producción de matriz extracelular e infiltrado inflamatorio crónico con macrófagos y linfocitos. Todo lo anterior le otorgó altos índices de puntaje Ascroft.

El modelo animal presentado aquí se podría combinar con métodos diagnósticos por imagen para seguir el curso del desarrollo de enfermedades pulmonares humanas y sus terapias (26, 27).

Igual que en la literatura mundial, el modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina construido en este trabajo cumple

varios de los criterios que se presentan en la enfermedad humana, como son la inflamación y la reparación aberrante del tejido que lleva a focos de proliferación fibroblástica (28, 29, 30). Estos hallazgos cumplen parcialmente con los criterios de la enfermedad humana.

En Colombia se ha desarrollado con éxito el modelo animal de fibrosis pulmonar en ratones con el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*, que produce una de las más importantes enfermedades sistémicas por hongos en Latinoamérica (31).

En conclusión, en este trabajo se ha descrito la construcción de un modelo animal de fibrosis pulmonar inducido farmacológicamente mediante el tratamiento con Bleomicina. A nuestro entender, esta es la primera vez que se describe la construcción de este modelo en nuestro país.

El modelo ya implementado servirá a nuestro grupo y a otros grupos de investigación nacionales e internacionales como herramienta en estudios tendientes a investigar las bases moleculares subyacentes en la fisiopatología de la fibrosis pulmonar y a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas como moléculas o principios activos para el tratamiento de la misma.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena y a la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, D. C.) por apoyar esta investigación con sus recursos científicos, académicos y locativos; a los integrantes del Semillero Unimol de la Universidad de Cartagena, al médico José Pomares Estrada (anestesiólogo), a las profesionales Zoraya Rodríguez y María Vallejo del Laboratorio de Investigaciones de la Universidad de Cartagena; a la Clínica Veterinaria Mascotas (Cartagena) por su colaboración en el manejo inicial de los animales.

**Conflicto de intereses:** ninguno.

**Financiación:** este trabajo fue financiado con recursos propios del Grupo de Investigación UNIMOL de la Universidad de Cartagena.

## REFERENCIAS

1. Vaillant P, Menard O, Vignaud JM, Martinet N, Martinet Y. The role of cytokines in human lung fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 1996;51(2):145-52.
2. Collins SL, Chan-Li Y, Hallowell RW, Powell JD, Horton MR. Pulmonary vaccination as a novel treatment for lung fibrosis. *PLoS ONE* 2012;7(2):e31299.
3. Yildirim Z, Kotuk M, Iraz M, Kuku I, Ulu R, Armutcu F et al. Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther* 2005;18(5):367-73.
4. Green FHY. Overview of pulmonary fibrosis. *Chest* 2002 ;122:334S-339S.
5. Antoniou KM, Pataka A, Bouros D, Siafakas NM. Pathogenetic pathways and novel pharmacotherapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20(5):453-61.
6. Ask K, Martin GEM, Kolb M, Gauldie J. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(4):389-93.
7. Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling. *J. Clin Invest* 2004;113(2):148-57.
8. Kimura T, Ishii Y, Yoh K, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T et al. Overexpression of the transcription factor GATA-3 enhances the development of pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol* 2006;169(1):96-104.
9. Ask K, Labiris R, Farkas L, Moeller A, Froese A, Farncombe T et al. Comparison between conventional and «clinical» assessment of experimental lung fibrosis. *J Transl Med* 2008;6:16.
10. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(2):175-81.
11. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 2005;5(2):102-12.
12. Froundarakis M, Hatzimichael E, Kyriazopoulou L, Lagos K, Pappas P, Tzakos A, Karavasilis V et al. Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 2013; 87:90-100.
13. Schelegle ES, Walby WF, Mansoor JK, Chen AT. Lung vagal afferent activity in rats with bleomycin-induced lung fibrosis. *Respir Physiol* 2001;126(1):9-27.
14. Congreso de Colombia. Ley 84 de 1989, 27 de diciembre de 1989.
15. Ministerio de Salud. Resolución 8430 de 1993, 4 de octubre de 1993.
16. Lizio R, Westhof A, Lehr CM, Klenner T. Oral endotracheal intubation of rats for intratracheal instillation and aerosol drug delivery. *Lab. Anim.* 2001;35(3):257- 60.
17. Dussaubat N, Lathrop ME, Oyarzún MJ, Mendoza R, Capetillo M. Daño pulmonar experimental por bleomicina en ratas: alteraciones del lavado broncoalveolar e histopatología [Experimental pulmonary damage by bleomycin in rats: changes in bronchoalveolar lavage and histopathology]. *Rev. Chil. Enferm. Respir* 1992;8(2):94 -101.
18. Cryan S-A, Sivadas N, Garcia-Contreras L. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev* 2007; 59(11):1133-51.
19. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol* 1988;41(4):467-70.
20. López E, Pozo V del, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E et al. Inhibition of Chronic Airway Inflammation and Remodeling by Galectin-3 Gene Therapy in a Murine Model. *J Immunol* 2006;176(3):1943-50.
21. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a

- useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2008;40(3):362-82.
22. Molina-Molina M, Pereda J, Xaubet A. Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: current usefulness and future promise. *Arch. Bronconeumol* 2007;43(9):501-7.
  23. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir. Res* 2002;3:3.
  24. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest* 2007;117(3):549-56.
  25. Plazas R, Andrés Avila. Tumores de células germinales. *Revista Colombiana de Cancerología* 2002;6(1):33-46.
  26. Pinart M, Serrano-Mollar A, Negri EM, Cabrera R, Rocco PRM, Romero PV. Inflammatory related changes in lung tissue mechanics after bleomycin-induced lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160(2):196-203.
  27. Pinart M, Serrano-Mollar A, Llatjós R, Rocco PRM, Romero PV. Single and repeated bleomycin intratracheal instillations lead to different biomechanical changes in lung tissue. *Respir Physiol Neurobiol* 2009;166(1):41-6.
  28. Kolb M.R.J AK, A M, Gauldie J, Farncombe T.H, Labiris R. The use of small animal imaging in respiratory disease drug discovery. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2008;5(2):81-5.
  29. Moeller A, Rodríguez JC, Wang L, Gauldie J. Models of pulmonary fibrosis. *Drug discovery Today* 2006; 3(3): 243-9.
  30. Phillips J, Peng R, Burns L, Harris P, Garrido R, Tyagi G et al. Bleomycin induced lung fibrosis increases work of breathing in the mouse. *Pulm. Pharmacol. Ther* 2012;25: 281-5.
  31. Naranjo T, Lopera D, Díaz-Granados L, Duque J, Restrepo A, Cano L. Histopathologic and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine model of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2010; 12: 1153-62.